

**Analyse der Expression von GPR55 mRNA Spleißvarianten
im Kontext der Replikation des Hepatitis-C-Virus**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jost, Elena, 08.08.1998
aus Gießen

Gießen (2026)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Biochemisches Institut

Gutachter:

Apl. Prof. Dr. Michael Niepmann

Gutachter:

Prof. Dr. John Ziebuhr

Tag der Disputation: 10.04.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Hepatitis-C-Virus	1
1.1.1	Systematik und Genotypen.....	2
1.1.2	Organisation des Viruspartikels	2
1.1.3	Genomaufbau	3
1.1.4	Virale Proteine	4
1.1.5	Viraler Replikationszyklus.....	6
1.1.5.1	Aufnahme in die Wirtszelle.....	6
1.1.5.2	IRES-abhängige Initiation der Translation.....	6
1.1.5.3	Translation und Prozessierung des Polyproteins.....	7
1.1.5.4	Replikation des viralen Genoms.....	8
1.1.5.5	Zusammenbau und Freisetzung der Viruspartikel.....	9
1.1.6	HCV und die angeborene Immunantwort	10
1.1.6.1	Interferon Stimulated Genes	12
1.1.6.2	Immunevasion von HCV.....	12
1.1.7	Interaktion mit Wirtsfaktoren	13
1.1.7.1	microRNAs	14
1.1.7.2	HCV und miRNA-122	15
1.1.7.3	Lange nicht-kodierende RNAs	16
1.1.7.4	Antivirale und provirale lncRNAs.....	18
1.2	Die lnc-ITM2C-1 - GPR55 - ISG Regulationsachse in der HCV-Infektion	19
1.2.1.1	lnc-ITM2C-1	19
1.2.1.2	GPR55 und HCV	20
1.2.1.3	GPR55: Klassifizierung, Signalwege und (patho)physiologische Wirkung.....	21
1.2.1.4	Expressionsprofil von GPR55	27
1.2.1.5	Interaktion zwischen lnc-ITM2C-1 und GPR55	28
2	Ziel der Arbeit.....	29
3	Material und Methoden.....	31
3.1	Materialien	31
3.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	31
3.1.2	Geräte	31
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	32
3.1.4	Puffer und Lösungen	33
3.1.5	Antikörper	36
3.1.6	Enzyme.....	36
3.1.7	Kit-Systeme	37
3.1.8	Nukleotide und Oligonukleotide	37

3.1.8.1	Nukleotide	37
3.1.8.2	RNA-Oligonukleotide.....	37
3.1.8.3	DNA-Oligonukleotide.....	38
3.1.9	Plasmid	40
3.1.10	Größen- und Längenstandards.....	40
3.1.11	Zelllinie.....	40
3.1.12	Kulturmedien.....	41
3.1.13	Computerprogramme.....	41
3.2	Methoden.....	42
3.2.1	Zellbiologische Methoden	42
3.2.1.1	Arbeiten mit Zellen	42
3.2.1.2	Auftauen eukaryotischer Zellen.....	42
3.2.1.3	Kultivierung und Splitten eukaryotischer Zellen	43
3.2.1.4	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer improved Zählkammer.....	43
3.2.1.5	Aussäen eukaryotischer Zellen	44
3.2.1.6	Einfrieren eukaryotischer Zellen.....	44
3.2.1.7	Transfektion mit Lipofectamine 3000	45
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	46
3.2.2.1	Arbeiten mit RNA.....	46
3.2.2.2	RNA-Extraktion.....	46
3.2.2.3	Herstellung von saurem Phenol-Chloroform	47
3.2.2.4	Qubit™-Messung	48
3.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	48
3.2.2.6	Reverse Transkription mit Maxima RT und Gen-spezifischen Primern.....	49
3.2.2.7	Reverse Transkription mit QuantaBio cDNA Flex Kit und Gen-spezifischen Primern.....	50
3.2.2.8	Reverse Transkription mit Random Primern	51
3.2.2.9	Genomische DNA-Extraktion	53
3.2.2.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (Endpoint-PCR).....	54
3.2.2.11	Acrylamid-Gelelektrophorese.....	55
3.2.2.12	RT-PCR als Prä-Amplifikation vor RT-qPCR	56
3.2.2.13	PCR-Aufreinigung	57
3.2.2.14	Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR)	57
3.2.2.15	Primer Effizienz Bestimmung mittels Standardkurven	59
3.2.3	Arbeiten mit HCV Plasmid	60
3.2.3.1	Plasmidpräparation und Restriktionsverdau.....	60
3.2.3.2	In-vitro-Transkription	61
3.2.3.3	DNase-Verdau.....	62
3.2.3.4	miRNA-122 Hybridisierung.....	62
3.2.4	Proteinbiochemische Methoden	62
3.2.4.1	Lyse der Zellen.....	63
3.2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	63

3.2.4.3	Western Blot.....	65
3.2.4.4	Immunochemie zur Detektion der Proteine.....	65
3.2.5	Statistik.....	66
3.2.5.1	Delta-delta Ct-Methode.....	66
3.2.5.2	Mann-Whitney Test.....	66
3.2.6	Bioinformatische Methoden.....	67
3.2.6.1	Sequenzanalysen und Alignments.....	67
3.2.6.2	Primer-Design.....	67
3.2.7	Textverfassung und Literaturverwaltung.....	69
4	Ergebnisse.....	70
4.1	Gesamt-RNA-Extraktion.....	70
4.1.1	Qualitative Anforderungen an die RNA-Proben und Methoden zur Qualitätsbestimmung.....	70
4.1.2	Entfernung der gDNA durch saure Phenol-Chloroform-Extraktion und DNase Behandlung mit RNase-Inhibitor.....	72
4.1.3	Neues Protokoll zur RNA-Extraktion: Troubleshooting.....	75
4.1.4	Alternative RNA-Extraktionsprotokolle ohne DNase-Behandlung.....	77
4.1.5	Untersuchung der RNA auf residuale genomische DNA mittels RT-qPCR.....	78
4.1.6	Alternativen zu saurem Phenol von Thermo Fisher Scientific.....	80
4.1.6.1	Verdau mit DNase I und rDNase.....	80
4.1.6.2	Saures Phenol alternativer Hersteller.....	82
4.2	Untersuchung der Expression von GPR55 mRNA Spleißvarianten in Huh-7 Zellen.....	84
4.2.1	Alignments von GPR55 Gensequenzen und mRNA Spleißvarianten.....	84
4.2.2	Validierung von Varianten-spezifischen Primern an genomischer DNA.....	90
4.2.3	Endpoint-PCRs mit langen Amplikons.....	92
4.2.4	RT-qPCRs mit GPR55 mRNA Varianten-spezifischen Primern.....	93
4.2.4.1	Primer Set 1.....	95
4.2.4.2	Primer Set 2.....	96
4.2.4.3	Primer Set 3.....	97
4.2.4.4	Primer Set 4.....	98
4.2.4.5	Primer Set 5.....	99
4.2.4.6	Primer Set 6.....	100
4.2.4.7	Primer Set 7.....	101
4.2.4.8	Primer Set 8.....	102
4.2.4.9	Primer Set 9.....	103
4.2.4.10	Primer Set 10.....	104
4.2.4.11	Primer Set 11.....	105
4.2.4.12	Primer Set 12.....	106
4.2.4.13	Primer Set 13.....	107
4.2.4.14	Primer Set 14.....	108
4.2.5	Effizienzbestimmung der Primer Sets mithilfe von Standardkurven.....	109

4.2.5.1	Primer Set 4	111
4.2.5.2	Primer Set 5	111
4.2.5.3	Primer Set 6	112
4.2.5.4	Primer Set 7	113
4.2.5.5	Primer Set 8	113
4.2.5.6	Primer Set 10	114
4.2.6	Transfektion von full length HCV-RNA in Huh-7 Zellen und Expressionsanalyse der GPR55 mRNA Spleißvarianten	115
4.2.6.1	Transfektion und Western Blot	116
4.2.6.2	Expressionsanalysen der Spleißvarianten mittels RT-qPCR	117
5	Diskussion	120
5.1	RNA-Extraktion	121
5.2	GPR55 und seine Rolle im HCV Replikationszyklus	123
5.2.1	GPR55 als (Endo)Cannabinoid-Rezeptor und LPI-Rezeptor	123
5.2.1.1	Endocannabinoide und ihre Rolle bei Lebererkrankungen	123
5.2.1.2	GPR55 als Immunmodulator	125
5.2.2	GPR55 mRNA Expressionsanalyse nach HCV Transfektion	126
5.3	Technische und methodische Limitationen	127
5.3.1	Reverse Transkription	127
5.3.2	RT-qPCR und Varianten-spezifisches Primer Design	129
5.3.3	Expressionsanalyse nach HCV Transfektion	130
5.3.4	Annotationen von mRNA Spleißvarianten in Datenbanken	131
5.3.4.1	Neue Annotationen von GPR55 Spleißvarianten	132
6	Zusammenfassung	135
7	Conclusion	137
8	Abkürzungsverzeichnis und Glossar	139
9	Abbildungsverzeichnis	143
10	Tabellenverzeichnis	145
11	Literaturverzeichnis	146
12	Anhang	167
13	Publikationsverzeichnis	186
	Ehrenwörtliche Erklärung	187
	Danksagung	188

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis-C-Virus

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist ein durch Blut übertragenes, hepatotropes Virus, das eine akute oder chronische Hepatitis in infizierten Individuen verursacht. Weltweit sind schätzungsweise über 50 Millionen Menschen mit HCV infiziert, wobei die Prävalenzen in der Literatur je nach Quelle unterschiedlich angegeben werden (Thrift et al., 2017; World Health Organization, 2023). Die höchste Krankheitslast besteht in der europäischen und östlichen Mittelmeerregion sowie in Südostasien, im Westpazifik, in Afrika und in Nord-, Mittel- und Südamerika (World Health Organization, 2023). Die Infektion erfolgt durch Blutübertragung, beispielsweise bei der Transfusion von infizierten Blutkonserven, bei unhygienischen chirurgischen, kosmetischen oder zahnärztlichen Eingriffen, Nadelstichverletzungen, Organtransplantationen sowie weniger häufig durch sexuelle oder vertikale Transmission (Liu und Kao, 2023).

Eine akute HCV-Infektion ist in den meisten Fällen asymptomatisch. Falls Symptome auftreten, umfassen diese u. a. Fieber, Abgeschlagenheit, Übelkeit und Erbrechen, Bauchschmerzen, dunkel verfärbten Urin, Gelenkschmerzen und Ikterus. 15 - 45 % der Infizierten erreichen eine Spontanheilung innerhalb von sechs Monaten ohne jegliche antivirale Behandlung. Demgegenüber entwickeln 55 - 85 % eine chronische Hepatitis. Innerhalb von 20 Jahren entwickeln 15 - 30 % der chronisch Infizierten eine Leberzirrhose. Eine weitere lebensbedrohliche Komplikation ist das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) (Liu und Kao, 2023; World Health Organization, 2023).

Die Diagnose einer Infektion mit HCV erfolgt in zwei Schritten: Zunächst werden serologische Tests zum Nachweis von anti-HCV-Antikörpern durchgeführt. Im Falle eines positiven Nachweises wird die Diagnose einer chronischen Infektion durch die Detektion der HCV-RNA bestätigt. Es werden darüber hinaus Schnelltests zur Detektion des HCV Core Antigens entwickelt (Roger et al., 2021). Besteht eine chronische Infektion, ist die Indikation zur antiviralen Therapie gegeben. Die Therapie mit Interferon- α ist heutzutage durch die Einführung der direkten antiviralen Medikamente (DAA, direct antiviral agents) obsolet geworden. Am häufigsten eingesetzt werden die pangenotypisch wirksamen und mittlerweile preiswerter verfügbaren DAAs Sofosbuvir und Daclatasvir. Durch die Entwicklung von Generika sind die initial sehr teuren DAAs heutzutage in einigen Ländern, u. a. Indien und China, breiter einsetzbar (World Health Organization, 2018).

Aufgrund der mittlerweile guten Behandlungsmöglichkeiten hat die WHO das Ziel definiert, HCV bis zum Jahr 2030 zu eliminieren (World Health Organization, 2018). Wegen

der noch immer hohen Behandlungskosten und immer wieder auftretenden DAA-resistenten Stämmen wird für das Erreichen dieses Ziel weiterhin an der Entwicklung eines Impfstoffes gearbeitet (Roingeard und Beaumont, 2020). Bis dato (2025) gibt es jedoch noch keinen zugelassenen Impfstoff zur wirksamen Prävention von HCV-Infektionen.

1.1.1 Systematik und Genotypen

Das Internationale Komitee für Virustaxonomie (engl. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) unterteilt Viren systematisch in Familien und Gattungen (ICTV, 2024). Das Hepatitis-C-Virus gehört der Familie der membranumhüllten Flaviviren an, die ein nicht-segmentiertes Plus-Strang RNA-Genom von ca. 9000 - 13.000 bp Länge ohne Poly(A)-Trakt besitzen (Simmonds et al., 2017). Aufgrund der Organspezifität wird das HC-Virus außerdem dem Genus Hepacivirus („hepar“, lat. für Leber) zugeordnet. Es werden mittlerweile 8 Genotypen mit 93 Subtypen unterschieden, nachdem 2018 ein neuer Genotyp identifiziert wurde (Borgia et al., 2018; Bukh et al., 2024). Die hohe Varianz der Sequenzen lässt sich durch die Fehleranfälligkeit der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase erklären. Weltweit ist Genotyp 1 am häufigsten (49,1 %), gefolgt von Genotyp 3 (17,9 %), Genotyp 4 (16,8 %) und 2 (11,0 %). Die Bestimmung des Genotyps ist wichtig, da sie eine speziell angepasste Therapie für Patient*innen ermöglicht.

1.1.2 Organisation des Viruspartikels

Hepatitis-C-Virionen, die einzelnen Viruspartikel, die sich außerhalb der Zelle befinden, sind pleomorph, jedoch vorwiegend sphärisch geformt mit einem Durchmesser von 40 - 100 nm und einer sehr heterogenen Dichte (Catanese et al., 2013). Umgeben sind sie von einer Lipiddoppelschicht, in die u. a. Apolipoproteine und die beiden viruseigenen Strukturproteine E1 und E2 (engl. envelope) eingelagert sind (Gastaminza et al., 2010). Darunter befindet sich das Viruskapsid, das sich aus den viralen Core-Proteinen zusammensetzt und das einzelsträngige, positiv orientierte RNA-Genom des Virus umhüllt (Bartenschlager et al., 2011). Der Zusammenbau der Viruspartikel hängt eng mit der Synthese von wirtseigenen Very Low Density Lipoproteinen (VLDLs) zusammen. Es wird angenommen, dass ein Großteil der im Blut zirkulierenden Hepatitis-C-Virionen als Lipoviropartikel (LVP) vorliegen. Die Assoziation der Viruspartikel mit Lipiden und Apolipoproteinen scheint das Virus vor der Neutralisation durch antivirale Antikörper zu schützen sowie den Eintritt in die Wirtszelle über Rezeptoren, beispielsweise den LDL-Rezeptor, zu vereinfachen (Bartenschlager et al., 2011).

1.1.3 Genomaufbau

Das Genom des Hepatitis-C-Virus besteht aus einem einzelsträngigen, positiv (+)-orientierten RNA-Strang von ca. 9600 Nukleotiden Länge. Ein einzelner, offener Leserahmen (engl. open reading frame, ORF) codiert für das virale Polyprotein, das durch verschiedene Proteasen in Strukturproteine (Core, E1, E2) sowie Nicht-Strukturproteine (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) gespalten wird (Lohmann, 2013). Der ORF wird auf beiden Seiten von untranslatierten Regionen (UTR) flankiert. Diese 5'-UTR und 3'-UTR sind hoch strukturiert und spielen eine tragende Rolle bei der Replikation und Translation des Virus (Fricke et al., 2015; Lohmann, 2013; Tabata et al., 2020).

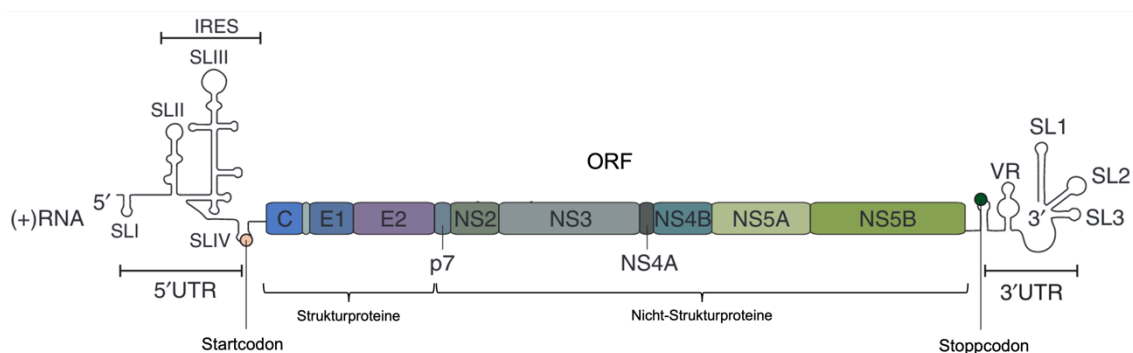


Abbildung 1: Aufbau des HCV Genoms (Tabata et al, 2020).

Der einzelsträngige positiv-orientierte RNA-Strang besteht aus der 5'-UTR, einem offenen Leserahmen (ORF) für das virale Polyprotein sowie einer 3'-UTR. Die viralen Proteine werden nach Prozessierung in Struktur- und Nicht-Strukturproteine eingeteilt. SL = Stem loop, UTR = untranslatierte Region, IRES = Internal Ribosomal Entry Site, VR = variable Region. Grafik bearbeitet aus Tabata et al., 2020 nach freundlicher Genehmigung der Autor*innen.

Die 5'-UTR des HCV Genoms beinhaltet vier Haarnadelschleifen (engl. stem loops, SL I - IV), konservierte RNA-Sekundärstrukturen mit verschiedenen Funktionen im viralen Replikationszyklus. SL II, III und IV bilden zusammen mit den initialen 20 - 30 Nukleotiden (nt) der codierenden Sequenz die interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. internal ribosomal entry site, IRES), die eine Cap-unabhängige Translation des viralen Polyproteins erlaubt (Fricke et al., 2015; Tabata et al., 2020; Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Außerdem befinden sich in der 5'-UTR zwischen SL I und II zwei Bindungsstellen für die leberspezifische microRNA-122, deren Anlagerung sich positiv auf die Replikation, Translation und Stabilität der HCV-RNA auswirkt (Henke et al., 2008; Jopling et al., 2005; Nieder-Röhrmann et al., 2017; Niepmann et al., 2018; Shimakami et al., 2012).

Die 3'-UTR besitzt eine essenzielle Rolle in der viralen minus-Strang RNA-Synthese. Sie beinhaltet eine variable Region (VR), einen poly-U/UC Trakt und eine konservierte Struktur, genannt 3'X oder X-tail (Friebe und Bartenschlager, 2002).

Eine weitere wichtige Haarnadelstruktur ist das *Cis*-regulatorische Element (CRE) im codierenden Bereich von NS5B. Es reguliert u. a. die Translation herunter, während es sich positiv auf die Replikation des viralen Genoms auswirkt (Friebe et al., 2005).

1.1.4 Virale Proteine

Das virale Polyprotein besteht aus ca. 3000 Aminosäuren und wird co- und post-translational durch zelluläre und virale Proteasen zu 10 reifen Struktur- und Nicht-Strukturproteinen prozessiert (Moradpour und Penin, 2013):

Core: Das erste Strukturprotein des ORF ist das Core-Protein, das das virale Nukleokapsid formt. Es besteht aus einer N-terminalen hydrophilen Domäne 1 (D1), die den Zusammenbau des Viruspartikels fördert und darüber hinaus eine RNA Chaperon Aktivität besitzt, die für die Verpackung des RNA Genoms in das Viruspartikel benötigt wird (Cristofari, 2004; Moradpour und Penin, 2013). Außerdem interagiert D1 mit zellulären Faktoren und trägt zu Funktionsveränderungen in der Wirtszelle bei (De Chasse et al., 2008). Die C-terminale hydrophobe Domäne 2 (D2) ist für die Assoziation mit zellulären Lipidtropfen verantwortlich (Boulant et al., 2006).

E1 und E2: Die Hüllproteine (engl. envelope) E1 und E2 sind Glykoproteine, die für den Zusammenbau des infektiösen Partikels, den Eintritt des Virus in die Zelle und die Fusion mit der endosomalen Membran unabdingbar sind (Moradpour und Penin, 2013; Zeisel et al., 2013). Die Typ 1 Transmembranproteine besitzen eine N-terminale Ektodomäne und eine kurze C-terminale Transmembrandomäne (TMD), die während der Synthese in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums eingelagert wird. Diese TMD ist mitverantwortlich für die Bildung von nicht-kovalenten E1-E2 Heterodimeren, die als wichtige Komponente der viralen Hülle gelten (Voisset und Dubuisson, 2004).

p7: Das 63 Aminosäuren lange integrale Membranprotein p7 formt Hexamere oder Heptamere in zellulären Membranen, die Kationenkanalaktivität besitzen (Chandler et al., 2012). Es wird den Viroporinen zugerechnet und erleichtert u. a. die Produktion und Freisetzung von infektiösen HCV Partikeln (Madan und Bartenschlager, 2015; Steinmann und Pietschmann, 2010). Trotz vieler Fortschritte in der Analyse von Struktur, Lokalisation und Funktion von p7 *in vitro* sind viele Aspekte bis dato noch unklar.

NS2: NS2 gehört zu den Nicht-Strukturproteinen und wird durch eine Cystin-Protease, die sich aus NS2 und dem N-terminalen Drittel von NS3 zusammensetzt, aus dem viralen Polyprotein geschnitten. Zwar ist NS2 selbst für die Replikation entbehrlich, jedoch ist diese Spaltung des Polyproteins zwischen NS2 und NS3 eine wichtige Voraussetzung für ein funktionstüchtiges NS3 Protein, welches wiederum die RNA Replikation

positiv beeinflusst (Moradpour und Penin, 2013). Die katalytische Aktivität von NS2 liegt in der C-terminalen Domäne, während der N-terminale Teil eine Membrandomäne darstellt (Jirasko et al., 2008). Unabhängig von seiner Protease-Aktivität spielt NS2 eine zentrale Rolle bei der Organisation und im Zusammenbau der infektiösen Partikel, wobei eine komplexe Interaktion mit weiteren Nicht-Struktur- und Strukturproteinen angenommen wird (Jirasko et al., 2008; Popescu et al., 2011).

NS3-4A-Komplex: Der nicht-kovalente Komplex aus NS3 und NS4A besitzt zwei Hauptfunktionen: Das N-terminale Drittel von NS3 fungiert als Serinprotease, wobei NS4A als Cofaktor agiert. Die C-terminalen zwei Drittel von NS3 besitzen eine NTPase/RNA-Helikase Aktivität (Morikawa et al., 2011; Raney et al., 2010). Diese entwindet unter ATP-Hydrolyse doppelsträngige oder einzelsträngige RNA Regionen mit komplexen Sekundärstrukturen und ist somit essenziell für die RNA Replikation (Moradpour und Penin, 2013). Darüber hinaus spielt die Helikase eine wichtige Rolle im Zusammenbau der viralen Partikel (Murray et al., 2008). Die Serinprotease hingegen spaltet zelluläre Proteine, die u. a. in die zelluläre angeborene Immunantwort involviert sind (K. Li et al., 2005; Meylan et al., 2005). Aus diesem Grund trägt die Protease maßgeblich zur Persistenz und Pathogenität von HCV bei (Morikawa et al., 2011). NS3 ist aufgrund seiner zentralen Rolle im viralen Replikationszyklus ein attraktives Ziel der antiviralen Therapie. Mittlerweile wird die dritte Generation der pangenotypisch wirksamen NS3 Protease-Inhibitoren (vor allem Glecaprevir und Voxilaprevir) erfolgreich mit hoher antiviraler Aktivität und Heilungsraten von über 95 % in Kombination mit NS5A-Inhibitoren in der HCV-Therapie eingesetzt (De Leuw und Stephan, 2018).

NS4B: Das integrale Membranprotein NS4B spielt eine wichtige Rolle im Zusammenbau eines funktionalen viralen Replikationskomplexes, indem es die Formation des sogenannten membranösen Netzes (engl. membranous web) induziert (Egger et al., 2002). NS4B interagiert dabei mit anderen Nicht-Strukturproteinen und bindet virale RNA (Einav et al., 2008). Darüber hinaus scheint es eine Rolle in Zusammenbau und Freisetzung der infektiösen Viruspartikel zu spielen (Jones et al., 2009).

NS5A: NS5A ist ein membranassoziiertes RNA-bindendes Phosphoprotein mit Zinkfingerdomäne. Im phosphorylierten Zustand moduliert es über die Rekrutierung zellulärer Proteine die HCV Replikation und den Zusammenbau der Viruspartikel (Zayas et al., 2016).

NS5B: Die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B synthetisiert ausgehend vom Plusstrang-RNA-Genom einen komplementären Negativstrang, welcher wiederum als Vorlage für die Synthese weiterer Plusstrang-Genome dient (Lohmann, 2013). Die

N-terminale katalytische Domäne besitzt eine für RNA-Polymerase klassische Struktur, die an die Anordnung von Fingern, Daumen und Handfläche einer rechten Hand erinnert (Behrens et al., 1996). Posttranslational wird das Enzym über die C-terminale Domäne so in der ER-Membran verankert, dass die katalytische Domäne eine zytosolische Orientierung besitzt (Schmidt-Mende et al., 2001; Vieyres und Pietschmann, 2019). Darüber hinaus spielt NS5B über *cis*-Regulation eine Rolle in der Formation des Replikationskomplexes und unterstützt den Virus-Zusammenbau (Gouklani et al., 2012).

1.1.5 Viraler Replikationszyklus

Der Replikationszyklus des Hepatitis-C-Virus lässt sich grob in vier Abschnitte unterteilen, die im Folgenden beschrieben sind. Der Lebertropismus des Virus wird u. a. durch verschiedene Interaktionen mit der Wirtszelle begründet.

1.1.5.1 Aufnahme in die Wirtszelle

Die Infektion mit Viruspartikeln erfolgt durch Blutübertragung. Anschließend werden die Viruspartikel, die in Assoziation mit Lipoproteinen vorliegen, über den Blutweg zu den Hepatozyten transportiert. Die Anlagerung an die Wirtszelle erfolgt über an der Zelloberfläche lokalisierte Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG). Insbesondere das Membrane-spanning Syndecan 1 (SDC1) wurde als Rezeptor für in der Virushülle eingelagertes Apo E identifiziert (Shi et al., 2013). Weiterhin gilt die Bindung des Hüllproteins E2 an den Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) als wichtiger Schritt während der Anlagerung des Viruspartikels (Scarselli et al., 2002). Auch dem LDL-Rezeptor wird in einigen Quellen eine Funktion während der Anlagerung und Aufnahme des Virus in die Zelle zugesprochen, wobei die Relevanz nicht eindeutig definiert ist (Albecka et al., 2012). Nach der Anlagerung erhält E2 Kontakt zu Tetraspanin CD81, wodurch die Fusion mit der Wirtszelle vorbereitet wird (Pileri et al., 1998). Anschließend erfolgt eine Co-Rezeptor Assoziation zwischen CD81 und Claudin 1 (CLDN1), wobei weitere Wirtszellfaktoren wie Proteinkinase A, EGFR und EphA2 beteiligt sind (Harris et al., 2010). Die Endozytose der Lipoviropartikel erfolgt Clathrin-abhängig (Blanchard et al., 2006; Coller et al., 2009). Anschließend formiert sich ein frühes Endosom, in welchem im sauren Milieu die virale Hülle mit der Wirtszellmembran fusioniert und das Viruskapsid ins Zytosol freigesetzt wird (Haid et al., 2009; Zeisel et al., 2013).

1.1.5.2 IRES-abhängige Initiation der Translation

Im Gegensatz zur Translation der Wirtzellproteine ist die Translation des HCV Polyproteins nicht Cap-abhängig. Sie wird durch die interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. internal ribosome entry site, IRES) initiiert, die aus den Stem loops SL II bis IV und einigen Nukleotiden der codierenden Sequenz besteht (Brown et al., 1992). Das Zentrum

der IRES besteht aus einer doppelten Pseudoknotenstruktur, geformt von den Abzweigungen am SL III_f (Niepmann et al., 2018). Die Bindung der IRES an die 40S Untereinheit des Ribosoms führt dazu, dass sich diese ohne die Unterstützung weiterer Faktoren an das Startcodon anlagert (Pestova et al., 1998). Anschließend wird der 48S-Präinitiationskomplex durch die eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) 2, 3 und 5 gebildet. eIF3 bindet an den apikalen Teil von SLIII, während eIF2 zusammen mit der Initiator-tRNA und GTP den tertiären Komplex eIF2-GTP-Met-tRNA^{iMet} bildet (Pestova et al., 1998; Sizova et al., 1998). Durch eIF5 wird zum einen die Bindung an das Startcodon unterstützt, zum anderen wird durch GTP-Hydrolyse die 60S Untereinheit rekrutiert und es bildet sich das 80S Ribosom (Locker et al., 2007).

Der eukaryotische Initiationsfaktor eIF2 trägt maßgeblich zur Regulation der Translation in der Zelle bei. Durch Zellstress oder die Aktivierung der angeborenen antiviralen Immunantwort kommt es zur Phosphorylierung der α -Untereinheit, wodurch seine Aktivität supprimiert wird. Trotzdem repliziert sich das Hepatitis-C-Virus effektiv in Zellen, indem es alternative Faktoren, namentlich eIF5B, eIF2D und eIF2A, für die Translationsinitiierung nutzt (Dmitriev et al., 2010; Kim et al., 2011; Niepmann und Gerresheim, 2020; Terenin et al., 2008).

1.1.5.3 Translation und Prozessierung des Polyproteins

Nach der Initiation der Translation durch die IRES wird das virale Polyprotein vollständig translatiert und anschließend prozessiert. Zusätzlich zu den eIFs tragen viele sogenannte ITAFs (IRES trans-agierende Faktoren), die am zellulären RNA-Metabolismus der Zelle beteiligt sind, zur viralen Translation bei (Niepmann und Gerresheim, 2020). Zudem wird die HCV Translation durch RNA-*cis*-Elemente in der 3'-UTR in *cis* stimuliert (Ito et al., 1998). Dieser Mechanismus könnte sicherstellen, dass nur vollständig intakte, undegradierete RNA translatiert und repliziert wird (Niepmann, 2013). Darüber hinaus beeinflusst die miRNA-122 die Translation des Polyproteins positiv (Henke et al., 2008).

Nach der vollständigen Translation am Endoplasmatischen Retikulum wird das Polyprotein durch virale (NS2, NS3-4A) und zelluläre (ER-Signalpeptidase, Signalpeptidase) Proteasen gespalten. Die resultierenden Proteine bleiben bis auf die virale Protease NS3 in der Membran des ER lokalisiert (Moradpour und Penin, 2013).

Durch verschiedene Mechanismen kommt es anschließend zur Umschaltung von Translation auf Replikation. Es wird vermutet, dass das 3'-Ende mit dem 5'-Ende des viralen Genoms interagiert und dass durch verschiedene RNA-bindende Proteine und RNA-Sekundärstrukturen die Umstellung von Translation auf Replikation ermöglicht wird (Niepmann et al., 2018).

1.1.5.4 Replikation des viralen Genoms

Der Replikationszyklus des Hepatitis-C-Virus findet an Membranoberflächen statt, an denen sich der Replikationskomplex aus den membrangebundenen viralen Proteinen bildet (Tabata et al., 2020). Dafür induziert das Virus Membranalterationen in infizierten Hepatozyten, die in der Bildung von Vesikeln mit einer einschichtigen Membran resultieren. Die Entstehung dieses membranösen Netzes ("membranous web") wird maßgeblich durch die Expression von NS4B und NS5A induziert (Egger et al., 2002; Romero-Brey et al., 2012). Hingegen induziert das Virus in Hepatomazellen, die das schnellreplizierende HCV Isolat JFH-1 beinhalten, vor allem Doppelmembranvesikel (DMV), die sich im Zytoplasma in der Nähe von Lipidtropfen befinden (Ferraris et al., 2010). DMVs entstehen aus der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), die sich, wahrscheinlich durch den Einfluss der viralen Proteine, eng um die Lipidtropfen im Zytoplasma legt (Tabata et al., 2020). Größtenteils sind die Vesikel mit dem ER verbunden (Romero-Brey et al., 2012). So ist nur eine kurze Transportstrecke der viralen RNA bis ins Lumen des ER nötig, wo schlussendlich die Knospung der Viruspartikel stattfindet.

Die Replikation wird durch verschiedene RNA-Strukturen, sowohl im Plusstrang als auch im Minusstrang des viralen Genoms, beeinflusst. Auch langstreckige RNA-RNA-Interaktionen (engl. long-range RNA-RNA interactions, LRIs) zwischen der 3'- und der 5'-UTR des Plusstrangs wurden beobachtet (Niepmann et al., 2018).

Ungefähr 12 - 24 h nach der Infektion der Zelle beginnt die erhöhte Replikation des viralen Genoms. Dabei wird die virale RNA-abhängige RNA Polymerase NS5B als Schlüsselenzym angesehen. NS5B ist C-terminal in der Membran verankert (Sesmero und Thorpe, 2015). Vermutlich startet die katalytische Domäne von NS5B die Synthese der RNA de novo direkt am 3'-Ende des viralen Genoms (Behrens et al., 1996). Es werden hohe Konzentrationen von GTP benötigt, das an die allosterische Domäne bindet, um strukturell die Initiation zu unterstützen (Lohmann et al., 1997). NS5B kann an zahlreiche RNA Sequenzen binden und besitzt somit keine Spezifität für die viralen Genomenden (Lohmann et al., 1997). Erst durch die Interaktion mit weiteren viralen Faktoren wie der NS3-Helikase und NS5A wird die Template-Spezifität gewährleistet (Binder et al., 2007).

Die Synthese des Minusstrangs endet nach Erreichen des Plusstrang-5'-Endes. Dieser neue Minusstrang wird nun als Vorlage für die Produktion von Nachkommen-Plussträngen verwendet. Das 3'-Ende des viralen Plusstrangs ist durch einen endständigen SL verborgen und erschwert somit die de novo Initiation. Im Vergleich dazu besitzt das 3'-Ende des Minusstrangs eine Haarnadelstruktur mit Überhang, was die Initiation

der Replikation erleichtert. Dies führt wahrscheinlich zu einer Regulation des Replikationsprozesses, die die Synthese des Plusstrangs deutlich effizienter ablaufen lässt und zu einer 10-fach höheren Menge an produzierten Plusstrang-Genomen im Vergleich zu Minussträngen führt (Tabata et al., 2020).

1.1.5.5 Zusammenbau und Freisetzung der Viruspartikel

Für den Zusammenbau und die Freisetzung von infektiösen Partikeln nutzt das HCV den sekretorischen Weg der wirtseigenen Low Density Lipoproteine (LDL). Infizierte Zelllinien und primäre Hepatozyten zeigen einen veränderten Lipidmetabolismus, eine erhöhte Triglyceridspeicherung sowie eine erhöhte Sekretion von VLDLs (Shimotohno, 2021). Für den Viruszusammenbau werden zytosolische Lipidtröpfchen (engl. lipid droplets, LDs) und verschiedene zelluläre Faktoren, beispielsweise die Diacylglycerol-Acyltransferase-1 (DGAT1) und die zytosolische Phospholipase A2 Gruppe IVA (PLA2G4A), benötigt (Herker et al., 2010; Menzel et al., 2012). Das Core Protein, das das virale Kapsid formt, ist sowohl mit der ER Membran als auch mit der Oberfläche von zytoplasmatischen LDs assoziiert (Moradpour et al., 1996). Auch NS5A interagiert mit dem Core Protein und ist gleichzeitig mit LDs assoziiert. Außerdem steht NS5A mit der ER-Membran in Verbindung. Es wird angenommen, dass NS5A dazu beiträgt, dass sich das membranöse Netz um die Lipidtröpfchen anordnet, die mit dem Core Protein beladen sind (Shi et al., 2002). Außerdem ist es für die Umschaltung von der Replikation zum Zusammenbau der Viruspartikel (engl. assembly) von Bedeutung (Bartenschlager et al., 2011). NS2 bildet zusammen mit anderen viralen Proteinen ein Gerüst, das die Struktur- und die Nichtstrukturproteine während des Viruszusammenbaus verbindet (Popescu et al., 2011). An dem sich anschließenden Prozess der Knospung in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums sind zahlreiche Faktoren beteiligt, die auch Bestandteile der VLDL-Synthese sind. In den Vesikeln konnten beispielsweise apoB, apoE und das mikrosomale Triglyceridtransferprotein (MTP) nachgewiesen werden (Huang et al., 2007). Im Lumen des ER assoziiert das Virus mit Apolipoproteinen und wird anschließend mit COPII Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert und von dort aus über den Golgi-Sekretionsweg aus der Zelle geschleust (Syed et al., 2017).

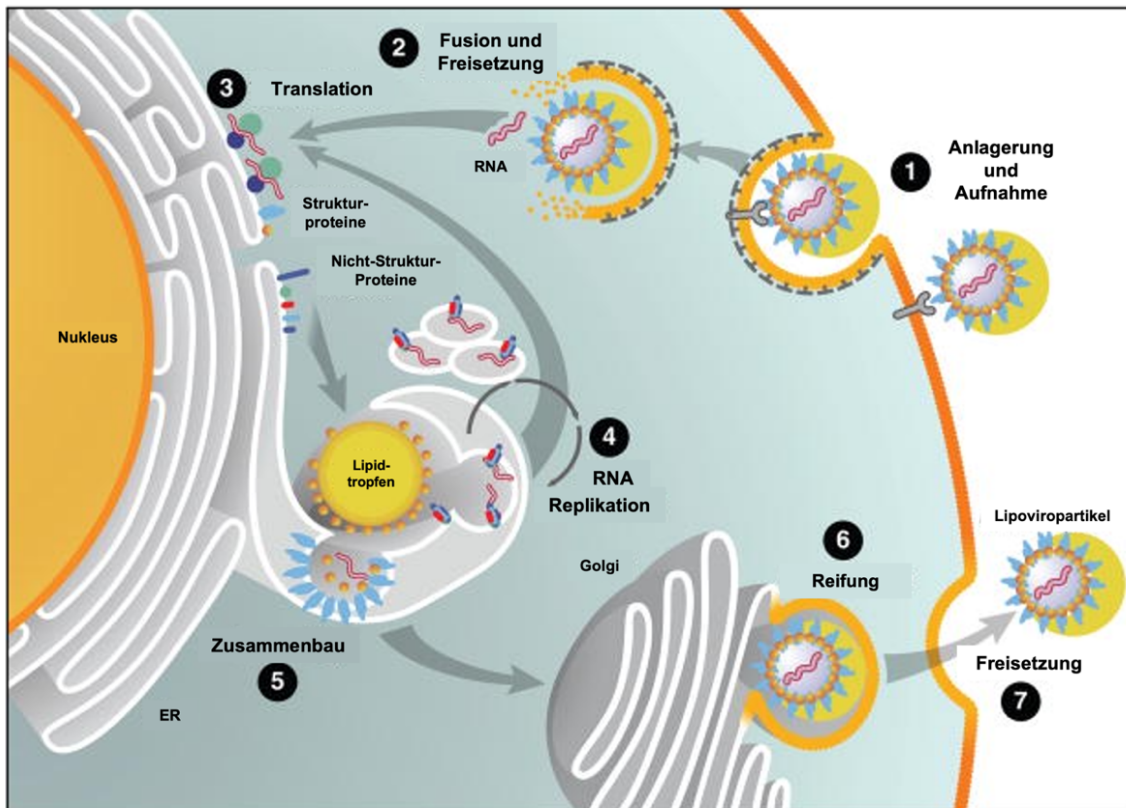


Abbildung 2: Der HCV Replikationszyklus (Herker und Ott, 2011).

Über Rezeptor-vermittelte Endozytose gelangen die Lipoviropartikel in die Leberzelle (1). Nach Fusion der viralen mit der zellulären Membran wird die virale RNA ins Zytosol freigesetzt (2). Am ER wird die virale RNA translatiert, das virale Polyprotein entsteht und wird in die viralen Struktur- und Nicht-Strukturproteine gespalten (3). Im membranösen Netz wird der Replikationskomplex gebildet, wo die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B über einen intermediären Minusstrang das Positivstrang RNA-Genom repliziert (4). Das virale Genom wird in Abhängigkeit von zellulären Lipid-tropfen in einer Virushülle verpackt (5). Die hergestellten Lipoviropartikel reifen im ER und werden über den Golgi-Apparat aus der Zelle geschleust (6 + 7). Grafik bearbeitet aus Herker und Ott, 2011 mit freundlicher Genehmigung der Autor*innen.

1.1.6 HCV und die angeborene Immunantwort

Die Immunantwort des Menschen lässt sich grob in die angeborene und die erworbene Immunität einteilen. Die angeborene Immunität stellt die erste Linie der Verteidigung dar und besteht aus physikalischen, chemischen, zellulären sowie humoralen Abwehrmechanismen gegen Krankheitserreger. Diese sind ab der Geburt vorhanden und können somit sofort nach einer Infektion auf ein Pathogen reagieren. Die erworbene Immunität hingegen beruht auf antigenspezifischen Zellen, die erst nach einer Aktivierung auf ein Antigen reagieren und somit später, aber auch spezialisierter als die angeborene Immunität, zur Immunreaktion beitragen. Im Folgenden soll besonders auf die angeborene Immunabwehr eingegangen werden.

Die HCV-Infektion einer Zelle wird über verschiedene Mustererkennungs-Rezeptoren (engl. pattern recognition receptors, PRRs) anhand von Pathogen-assoziierten

molekularen Mustern (PAMPs) erkannt. Beispielsweise detektiert im Cytosol der kanonische Sensor RIG-I (engl. retinoic acid-inducible gene I) das Virus, indem dieser an das virale RNA-Genom bindet. Außerdem können die nicht-kanonische Proteinkinase R (PKR) die 5'-UTR oder die DEAD-box Helikase 3 (DDX3X) die 3'-UTR erkennen (Arnaud et al., 2011, 2010; Pène et al., 2015; Saito et al., 2008). Weitere Sensoren sind der Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) und das Melanom differenzierungsassoziierte Protein 5 (MDA5) (Li et al., 2012; Xie et al., 2018a). Diese veranlassen über ihre jeweiligen Signalwege die Induktion der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Nukleärer Faktor κ b), Aktivatorprotein 1 (AP-1) und IRF (Interferon regulatorische Faktoren), die die Interferon-Synthese initiieren. In den meisten humanen Zellen wird so die Synthese der Typ I Interferone induziert, im Menschen bei einer HCV-Infektion aus dieser Gruppe hauptsächlich IFN- α und IFN- β (Wong und Chen, 2016). Darüber hinaus spielen auch Interferone Typ III eine wichtige Rolle in der antiviralen Immunreaktion (Metz et al., 2013).

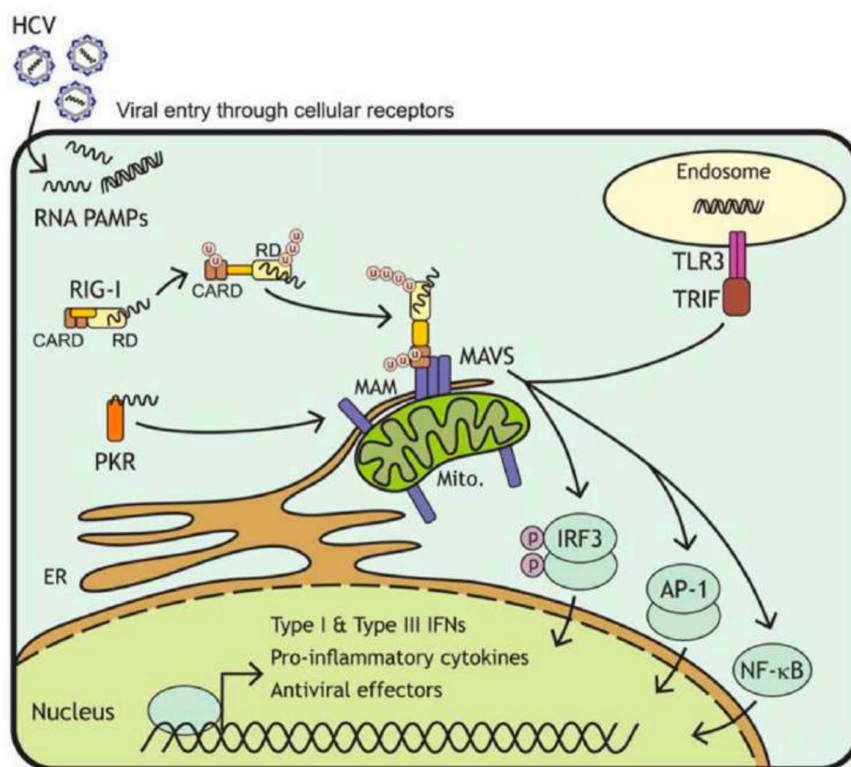


Abbildung 3: Antivirale Immunantwort gegen HCV in Hepatozyten (Gokhale et al., 2014).

Das Hepatitis-C-Virus wird anhand von PAMPs in den Zellen durch PRRs wie RIG-I, TLR3 und PKR, erkannt. Über die initiierten Signalwege werden Transkriptionsfaktoren wie IRF3, AP-1 und IRF3 aktiviert, die die Synthese von Typ I und III Interferonen, proinflammatorischen Zytokinen und antiviralen Effektorproteinen veranlassen. Grafik bearbeitet aus Gokhale et al., 2014 mit freundlicher Genehmigung der Autor*innen.

1.1.6.1 Interferon Stimulated Genes

Interferone (IFN) führen durch Bindung an ihre Rezeptoren in den Zellen zur Expression von zahlreichen antiviralen Genen. Durch Bindung an den IFN- α/β -Rezeptor, der ubiquitär exprimiert wird, aktivieren IFN Typ I den JAK/STAT Signalweg (engl. janus kinase/signal transducers and activators of transcription). IFN Typ III binden an ihren eigenen Rezeptor, initiieren aber ebenfalls diesen Signalweg. Es kommt zur Phosphorylierung, Dimerisierung und Transport von STAT1 und STAT2 in den Zellkern. Zusammen mit IRF9 bilden diese den IFN-stimulierten Gen Faktor 3 Komplex (ISGF3), der die Transkription von vielen Interferon Stimulated Genes (ISGs) induziert (Ivashkiv und Donlin, 2014; Schneider et al., 2014). Verschiedene ISGs reduzieren die HCV Replikation durch Beeinflussung der verschiedenen Schritte im viralen Replikationszyklus. Diese Effekte werden zusätzlich durch die Induktion von weiteren ISGs verstärkt („positive loop“). Beispiele für induzierte ISGs bei HCV-Infektion sind die Proteinkinase R (PKR), die dsRNA-spezifische Adenosin-Desaminase 1 (ADAR1), das 2'-5' Oligoadenylat-Synthetase (OAS)/RNaseL-System und das Lipidtropfen-bindende Protein Viperin (Han und Barton, 2002; Helbig et al., 2005; Pflugheber et al., 2002; Taylor et al., 2005). Darüber hinaus gibt es ISGs, welche die antivirale Antwort hemmen, um der Zelle wieder zur Homöostase zu verhelfen. Diese Faktoren werden teilweise wegen ihrer immunsuppressiven Wirkung auch als provirale ISGs bezeichnet (Unfried und Fortes, 2020).

1.1.6.2 Immunevasion von HCV

Um sich effizient in Zellen replizieren zu können, hemmt und umgeht das Hepatitis-C-Virus über verschiedene Mechanismen die angeborene Immunabwehr der Zellen.

Die NS3/4A Protease spaltet diverse Wirtsproteine und beeinträchtigt somit antivirale Signalwege (Gokhale et al., 2014). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass NS3/4A das zelluläre Signalprotein MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) spaltet, welches ein wichtiger Bestandteil des RIG-I-Signalwegs ist (X.-D. Li et al., 2005). Außerdem wird TRIF (Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta), ein Adapterprotein des TLR3-Signalwegs, durch NS3/A4 gespalten (K. Li et al., 2005). So werden infizierte Zellen in ihrer Produktion von Typ I Interferonen beeinträchtigt. Durch die Hochregulierung von SOCS3 und PP2A hemmt das HCV zudem indirekt den JAK-STAT-Signalweg der IFN (Duong et al., 2004).

HCV kann außerdem die frühe Expression von ISGs in infizierten Zellen stören, indem es die zelluläre Translation über eine Aktivierung der Proteinkinase R (PKR) beeinträchtigt. PKR phosphoryliert den eIF2 α , der in unphosphoryliertem Zustand essenziell ist für die Translation von 5'-Cap-mRNA (Garaigorta und Chisari, 2009). Wie oben beschrieben, ist die HCV Translation durch die IRES unabhängig von einer 5'-Cap

(s. 1.1.5.2). So könnte HCV die Translation von zellulären ISGs hemmen, während die Synthese des viralen Polyproteins nicht beeinflusst wird. Es wurden jedoch auch gegenteilige Effekte mit einer Inhibition der HCV Replikation durch PKR beobachtet. Die pro- oder antivirale Funktion von PKR hängt wahrscheinlich vom Zeitpunkt ihrer Aktivierung in der HCV-Infektion ab (Thimme et al., 2012).

Neben seinem Einfluss auf die ISG-Expression könnte auch die Anordnung des membranösen Netzes während der HCV Replikation dazu beitragen, dass virale PAMPs von zytosolischen PRRs schlechter erkannt werden (Gokhale et al., 2014). Darüber hinaus führt HCV zu einer erhöhten Teilung von Mitochondrien und gesteigerter Mitophagie, was wiederum die Immunantwort supprimiert (Castanier et al., 2010; Kim et al., 2014). Zudem triggert die HCV Replikation die „unfolded protein response“ (UPR), eine regulatorische Funktion in Zellen, die bei hohem ER-Stress zur Autophagie führt (Sir und James Ou, 2010). Dies ist normalerweise eine Strategie des Organismus in der Abwehr von mikrobiellen Infektionen, es wurde jedoch gezeigt, dass die UPR vom Hepatitis-C-Virus in der Frühphase des Replikationszyklus ausgenutzt werden kann (Dreux et al., 2009). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass HCV sich über Exosomen verbreiten und naive Huh-7.5 Zellen infizieren kann und so teilweise die Bindung neutralisierender Antikörper und somit auch einen Mechanismus des erworbenen Immunsystems umgeht (Ramakrishnaiah et al., 2013).

Zusammengefasst umgeht HCV über verschiedenste Mechanismen das Immunsystem. Seit einigen Jahren erweckt die Interaktion mit zellulären nicht-kodierenden RNAs immer mehr wissenschaftliches Interesse, weswegen darauf im Folgenden gesondert eingegangen werden soll.

1.1.7 Interaktion mit Wirtsfaktoren

Viren fehlt die Fähigkeit sich selbständig zu replizieren. Das Hepatitis-C-Virus verwendet deswegen für seinen Replikationszyklus bestehende wirtseigene Stoffwechselprozesse. In jedem Schritt, von der Aufnahme der Virionen bis zur Freisetzung neuer infektiöser Partikel, interagiert das Virus mit zahlreichen zellulären Proteinen. Zusätzlich kann das Virus mit nicht-kodierenden RNAs (engl. non-coding RNA, ncRNA) interagieren.

In der ausführlichen und 2023 umfassend überarbeiteten Datenbank „CHES“ (Comprehensive Human Expressed SequenceS), die auf RNA Sequencing Experimenten basiert, werden 19.838 protein-kodierende Gene und insgesamt 141.100 Transkripte gelistet. Von diesen Transkripten sind 99.201 als mRNA Spleißvarianten gekennzeichnet, während die restlichen Transkripte nicht-kodierende RNAs sind (Varabyou et al., 2023). Nicht-kodierende RNAs können grob in strukturelle (z. B. rRNAs,

snRNAs, snoRNAs) und regulatorische (z. B. miRNAs, lncRNAs, circRNAs) RNAs eingeteilt werden (Cipriano und Ballarino, 2018).

Tabelle 1: Auswahl an nicht-kodierenden RNAs und ihre Funktionen (Nordheim et al., 2018).

ncRNA	Funktion
Kleine nukleäre RNA (snRNA)	Splicing
Kleine nukleoläre RNA (snoRNA)	Modifikation von RNAs
Antisense-RNA (aRNA)	Genregulation, RNA-Abbau oder Stabilisierung
Kleine interferierende RNA (siRNA)	RNA-Interferenz
PIWI interagierende RNA (piRNA)	Transposonabwehr, epigenetische Effekte
Lange nicht-kodierende RNA (lncRNA)	Verschiedene regulatorische Funktionen
microRNA (miRNA)	Posttranskriptionale Genregulation, Silencing
Zirkuläre RNA (circRNA)	Verschiedene regulatorische Funktionen

Die Interaktion von HCV mit microRNAs und long non-coding RNAs soll im Folgenden genauer thematisiert werden.

1.1.7.1 microRNAs

Posttranskriptionell regulieren microRNAs (miRNAs) die Aktivität von ca. 30 % aller Protein-kodierenden eukaryotischen Gene (Filipowicz et al., 2008). Sie werden im Zellkern aus primären Vorgänger-RNAs hergestellt und anschließend im Zytoplasma zu ca. 22 bp miRNA-Duplex mit einem 3'-Überhang prozessiert (Zhang et al., 2004). Als solche werden sie in einem Protein-Komplex gebunden, der ein Argonaut (Ago) Protein mit Endonukleaseaktivität enthält. Um mit RNA interferieren zu können, wird der miRNA-Duplex vom thermodynamisch instabileren Ende aus entwunden. Dabei verbleibt der Strang, dessen 5'-Ende am instabileren Ende des Duplex lokalisiert ist (der "Guide Strand"), im Proteinkomplex, während der Gegenstrang (der „Passenger Strand“) degradiert wird (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003).

Abhängig davon, wie ausgeprägt die Basenpaarung zwischen dem miRNA-Protein (miRNP) Komplex und der Ziel-mRNA ist, unterscheidet sich der Effekt der Bindung. Bei vollständiger Komplementarität der miRNA Sequenz mit der mRNA (meist in der 3'-UTR) wird die mRNA von Ago2 gegenüber der miRNA degradiert (Filipowicz et al., 2008). Sofern die miRNA hingegen unvollständig an die Ziel-mRNA bindet, resultiert durch die

Wechselwirkung zwischen miRNP-Komplex und mRNA eine Translationsrepression (Doench et al., 2003).

Zahlreiche miRNAs interagieren mit dem Hepatitis-C-Virus, entweder direkt durch Bindung der viralen RNA oder indirekt durch die Interaktion mit zellulären RNAs, beispielsweise solche, die an der Immunreaktion beteiligt sind (Zhu et al., 2018). Durch eine HCV-Infektion werden beispielsweise die miRNA-155, miRNA-130a und miRNA-21 hochreguliert, welche die Immunantwort in der Zelle auf verschiedenen Signalwegen zugunsten des Virus beeinflussen (Bhanja Chowdhury et al., 2012; Jiang et al., 2014; Marquez et al., 2010). Besonders im Fokus steht seit ihrer Entdeckung die miRNA-122, deren Interaktion mit HCV im Folgenden genauer behandelt werden soll.

1.1.7.2 HCV und miRNA-122

Aufgrund seines RNA Plusstrang-Genoms ist das Hepatitis-C-Virus dafür prädestiniert, mit zellulären miRNAs durch direkte Bindung an seine Sequenz zu interagieren. Die miRNA-122 ist bevorzugt in Hepatozyten oder in der Hepatoma Zelllinie Huh-7 zu finden, wo sie 70 % der gesamten miRNAs ausmacht (Jopling, 2012). In der nicht-codierenden Region des HCV Genoms befinden sich je nach HCV Isolat mindestens fünf Bindungsstellen für die Kernsequenz von miRNA-122. Die Bindung der miRNA-122 an die hochkonservierten Sequenzen zwischen SLI und SLII in der 5'-UTR des HCV Genoms führt zu einer positiven Regulation der Replikation, Translation und Stabilität der HCV-RNA (Henke et al., 2008; Jopling et al., 2005; Shimakami et al., 2012). Die Rolle der miRNA-122 Bindungsstelle in der 3'-UTR ist bisher nicht vollständig geklärt, sie scheint jedoch weniger Einfluss auf die Translation und Replikation von HCV zu haben als die Bindung an die 5'-UTR (Niepmann, 2009). Es wird vermutet, dass durch die Bindung an das HCV Genom die miRNA-122 zu einem gewissen Teil sequestriert wird und für ihre regulatorischen Funktionen in der Zelle, u. a. im Cholesterolfstoffwechsel und als Tumorsuppressor, vermindert zur Verfügung steht (Bai et al., 2009; Esau et al., 2006).

Im Hepatozellulären Karzinom, einer Komplikation des HCV, sind die Konzentrationen von miRNA-122 im Vergleich zu gesunden Hepatozyten verringert und eine niedrige miRNA-122 Expression ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Coulouarn et al., 2009; Kutay et al., 2006). Die Überexpression von miRNA-122 reduziert die karzinogenen Eigenschaften in HCC Zelllinien und erhöht die Empfänglichkeit für Chemotherapeutika (Bai et al., 2009). Dies könnte einen direkten Zusammenhang zwischen der HCV-Infektion und der Tumorgenese darstellen. Trotzdem ist allein die Interaktion von HCV mit miRNA-122 und die assoziierte Verringerung der miRNA-122 Expression nicht der entscheidende Faktor in der Entwicklung eines Karzinoms, die über einen Zeitraum

von Jahren stattfindet und zahlreiche weitere Faktoren voraussetzt. Es kann nur spekuliert werden, ob die leichte Reduktion der miRNA-122 Konzentration in Hepatozyten zu einer karzinogenen Kaskade in den Zellen führt (Niepmann, 2009).

1.1.7.3 Lange nicht-kodierende RNAs

Lange nicht-kodierende RNAs (engl. long non-coding RNAs, lncRNAs) sind mit einer Länge von > 200 Nukleotiden länger als die zuvor beschriebenen miRNAs und machen einen beträchtlichen Anteil des nicht kodierenden Transkriptoms aus, wobei sich die Anzahl der gelisteten lncRNAs je nach Datenbank stark unterscheidet. In der Datenbank CHES3 werden beispielsweise 17.623 lncRNA Gene gelistet, die 34.708 Transkripte umfassen (Varabyou et al., 2023). Hingegen werden in den Datenbanken NONCODE V6 (173.112 Transkripte) und LNCipedia (127.802 Transkripte) eine deutlich höhere Anzahl an humanen lncRNAs inkludiert (Volders et al., 2019; L. Zhao et al., 2021). Diese Abweichungen sind u. a. durch einen großen Anteil computergestützter Vorhersagen begründet, bei denen unsicher ist, ob sie mit der Anzahl tatsächlich funktioneller Gene übereinstimmt (Varabyou et al., 2023).

Wie die proteinkodierenden mRNAs werden lncRNAs von der RNA Polymerase II transkribiert und sind häufig mit einer 5'-Cap versehen sowie gespleißt und polyadenyliert (Mattick et al., 2023; Quinn und Chang, 2016). Sie sind im Nukleus angereichert und insgesamt niedriger und gewebsspezifischer exprimiert als mRNAs (Ayupe et al., 2015; Statello et al., 2021). Zudem verfügen sie über konservierte Exon-Strukturen und Spleißstellen, wobei sie insgesamt weniger effizient als mRNA gespleißt werden (Mattick et al., 2023; Statello et al., 2021).

lncRNAs regulieren über verschiedene direkte und indirekte Interaktionen die Abläufe in der Zelle. Beispielsweise können nukleäre lncRNAs über sequenzspezifische Bindung mit der doppelsträngigen DNA interagieren und so die Transkription von Genen positiv oder negativ beeinflussen (Kalwa et al., 2016; Mondal et al., 2015; Postepska-Igielska et al., 2015). Auch über Histonmodifikationen regulieren sie die Genexpression. Die negative Ladung der lncRNA kann beispielsweise die positiv geladenen Histone neutralisieren, was zur Auflockerung der Chromatinstruktur führt (Mattick et al., 2023; Statello et al., 2021). Durch die Interaktion mit weiteren Chromatinmodifikatoren können lncRNAs durch deren Rekrutierung oder durch Abschirmung von DNA-Promotoren zur Aktivierung oder Herabregulierung der Gentranskription führen (Statello et al., 2021). Weiterhin modulieren lncRNAs über verschiedene Mechanismen die Transkription, u. a. als enhancer-associated lncRNAs (e-lncRNAs), sowie das Spleißen der Transkripte und interagieren mit der Polymerase II (Kulkarni et al., 2023; Statello et al., 2021). Die relative Position zwischen der lncRNA und der Nachbargene spielt dabei eine entscheidende

Rolle für die regulatorische Funktion (Statello et al., 2021). Im Zytoplasma können lncRNAs mit Proteinen interagieren und die mRNA Expression beeinflussen, indem sie auf die Stabilität und die Translation der mRNAs oder die Interaktion mit microRNAs einwirken (Mattick et al., 2023; Morlando et al., 2015). Darüber hinaus haben sie Einfluss auf die Funktion von Zellorganellen, wie z. B. die Exosomen und die Mitochondrien (Statello et al., 2021).

Die vielfältigen Interaktionen, die lncRNAs mit dem Zellmetabolismus zeigen, wirken sich auf verschiedene Bereiche im Organismus aus. Sie beeinflussen sowohl die Zelldifferenzierung, das Wachstum und die Reaktion auf Zellstress als auch physiologische und pathologische Mechanismen des Nerven-, Muskel-, kardiovaskulären, hämatopoetischen und Immunsystems (Statello et al., 2021). Auch in der Krebsentstehung und -progression spielen lncRNAs eine Rolle und werden zunehmend als therapeutischer Angriffspunkt erforscht (Mattick et al., 2023; Statello et al., 2021).

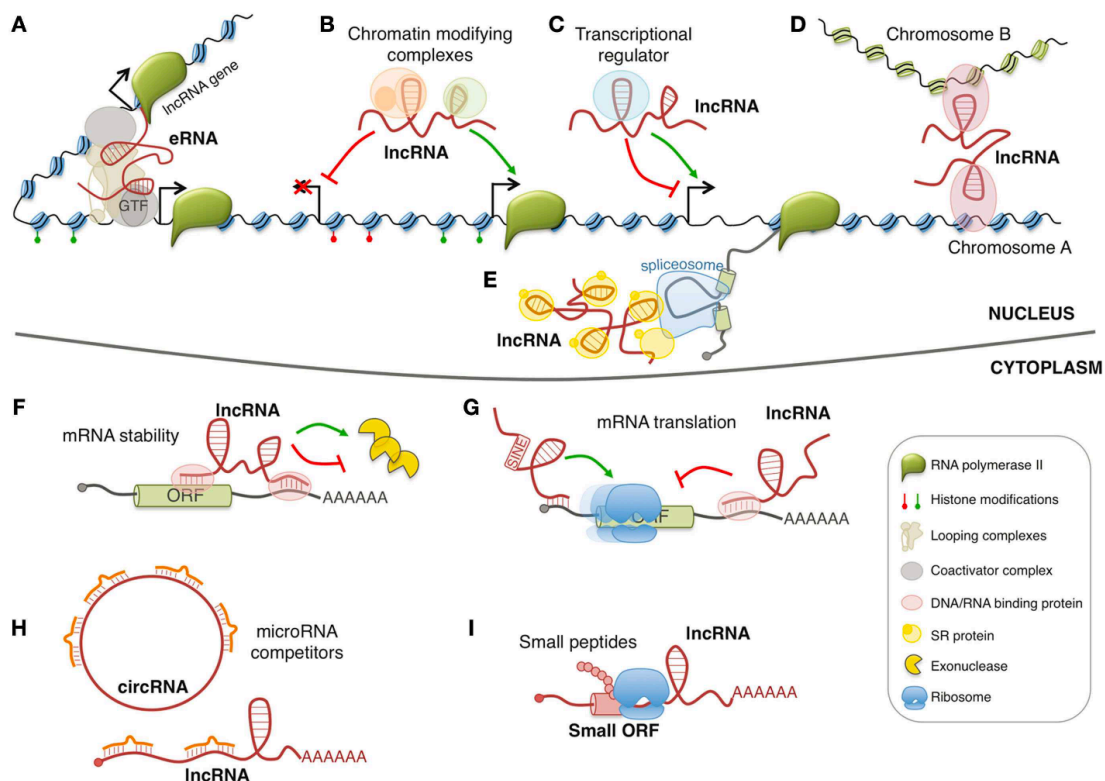


Abbildung 4: Zusammenfassung der lncRNA Funktionen (Morlando et al., 2015).

Die im Zellkern lokalisierten lncRNAs regulieren die Transkription als Verstärker-RNAs (engl. enhancer RNA, eRNA; A), indem sie Chromatin-modifizierende Komplexe rekrutieren (B) oder die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen (C). Sie können außerdem auf die räumliche Konformation von Chromosomen (D) oder das Spleißen der pre-mRNA einwirken (E). Im Zytoplasma modulieren sie die Expression von mRNA über die Stabilität (F), die Translation (G) oder die Interaktion mit microRNAs (H). Einige lncRNAs enthalten kleine offene Leserahmen (ORF), die zu biologisch aktiven Peptiden translatiert werden (I). Grafik entnommen aus Morlando et al., 2015 mit freundlicher Genehmigung der Autor*innen.

1.1.7.4 Antivirale und provirale lncRNAs

Die Expression von lncRNAs in der Zelle kann sowohl direkt durch eine virale Infektion als auch durch die Immunantwort verändert werden. Dabei nehmen lncRNAs sowohl provirale als auch antivirale Rollen im Zellmetabolismus ein und beeinflussen die zelluläre Immunantwort, den Replikationszyklus oder die Immunevasion von HCV.

Ein Beispiel für eine antivirale lncRNA ist GAS5 (growth arrest-specific 5), die durch Bindung des viralen Proteins NS3 und der miRNA-122 die Replikation des Virus inhibiert (Qian et al., 2016). ITPRIP-1 stimuliert die angeborene Immunantwort, indem es die Oligomerisierung und Aktivierung von MDA5 steigert (Xie et al., 2018b). Die Expression zahlreicher ISGs wird durch die lncRNA LUARIS hochreguliert und so die antivirale Immunantwort positiv beeinflusst (Nishitsuji et al., 2016). Die lncRNA BISPR (BST2 interferon stimulated positive regulator) wird durch IFN stimuliert und induziert das ISG BST2, was zu verringerter HCV-Virionenfreisetzung führt (Barriocanal et al., 2015).

Auf der anderen Seite wurden in den letzten Jahren einige lncRNAs identifiziert, die proviral wirken. NRIR (negative regulator of interferon response) supprimiert die Transkription diverser ISGs wie IFITM1, IFIT3, CXCL10 und ISG15 und trägt somit zur Inhibierung der Immunantwort bei (Kambara et al., 2014). Auch die lncRNA NRAV (negative regulator of antiviral response lncRNA), die durch das Influenza A Virus induziert wird, sowie EGOT (eosinophil granule ontogeny transcript) wirken durch die Hemmung von ISGs proviral (Carnero et al., 2016; Ouyang et al., 2014). Die durch HCV induzierte lncRNA Lethe erhöht die HCV Replikation, indem sie durch Bindung an NF- κ B die Transkription der antiviralen Faktoren 2',5'-Oligoadenylate Synthetase (OAS), Interferon-Regulatorischem Faktor 1 (IRF1) und der Proteinkinase R (PKR) unterbindet (Xiong et al., 2015b). Durch Promotoraktivierung und Histonmodifikation von IFN α -inducible protein 6 (IFI6) inhibiert die lncRNA-IFI6 die antivirale angeborene Immunantwort im HCV-infizierten Zellmodell (Liu et al., 2019). Zwei weitere lncRNAs, lnc-IGF2-AS und lnc-7SK, fördern die Bildung des membranösen Netzes in der Zelle, was die virale Replikation steigert (Xiong et al., 2015a). Die Detektion von HCV und die Synthese von IFN über den RIG-I-Signalweg wird durch lncATV gehemmt (Fan et al., 2019).

1.2 Die Inc-ITM2C-1 - GPR55 - ISG Regulationsachse in der HCV-Infektion

1.2.1.1 *Lnc-ITM2C-1*

Hu et al. untersuchten 2019 die Expression verschiedener lncRNAs sechs Tage nach HCV Transfektion in Huh-7.5 Zellen. Dabei zeigte sich u. a. eine Hochregulierung von Inc-ITM2C-1. Das Gen für diese lncRNA befindet sich auf Chromosom 2 in direkter Nachbarschaft zu den Genen des Integral Membrane Protein 2C (ITM2C) und G-protein coupled receptor 55 (GPR55). Die lncRNA selbst fand bis dato in der Literatur keine Erwähnung.

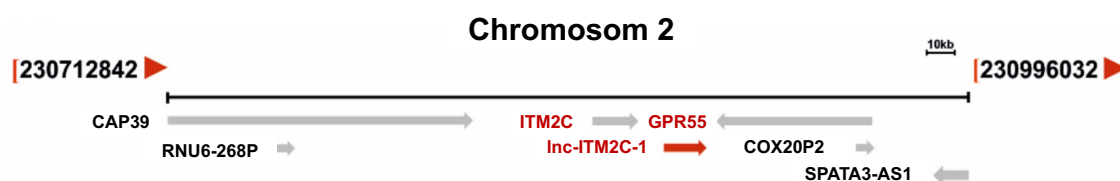


Abbildung 5: Genomische Lokalisation von Inc-ITM2C-1 und die Lagebeziehung mit den Genen, die für ITM2C (Integral Membrane Protein 2C) und GPR55 (G-protein coupled receptor 55) kodieren (Hu, 2019). Graphik bearbeitet nach Hu, 2019 mit freundlicher Genehmigung der Autorin.

Inc-ITM2C-1 wurde u. a. durch Analysen der ORFs und Listung in LNCipedia als nicht kodierende Sequenz eingestuft. Außerdem wurde eine Akkumulation dieser lncRNA im Nukleus beobachtet, wobei sich die Lokalisation durch HCV Transfektion nicht beeinflussen ließ (Hu et al., 2019).

Die Beeinflussung der HCV-Translation durch Inc-ITM2C-1 wurde durch eine Inc-ITM2C-1-Depletion der Huh-7.5 Zellen durch Gampers weiter untersucht. Dies sind einzelsträngige Antisense Nukleotide, die aus einem zentralen Block aus Desoxynukleotid-Monomeren flankiert von zwei „locked nucleic acid“ (LNA) Bereichen bestehen. Durch den zentralen DNA-Block wird eine RNase H vermittelte Degradation der Ziel-RNA induziert und somit ein Knockdown von lncRNA oder mRNA erreicht (Chan et al., 2006; Behlke, 2016). Es zeigte sich eine signifikante Reduzierung der viralen RNA und viralen Proteine nach einer Suppression von Inc-ITM2C-1, was zu der Annahme führte, dass diese lncRNA eine positive Regulation auf die HCV Replikation ausübte. Dabei zeichnete sich eine Korrelation zwischen der Menge an applizierten spezifischen Inc-ITM2C-1-Gampers und dem HCV Replikationslevel ab (Hu et al., 2019).

Weil vorherige Untersuchungen den regulatorischen Einfluss anderer lncRNAs auf deren benachbarte Gene gezeigt hatten, wurde die Expression von ITM2C1 und GPR55 sechs Tage nach HCV Transfektion ebenfalls untersucht. Während Inc-ITM2C-1 während der

HCV-Replikation hochreguliert wurde, zeigte ITM2C1 keine signifikanten Veränderungen der mRNA Expression. Auch die Expression der GPR55 mRNA war sechs Tage nach HCV Transfektion nicht verändert. Allerdings supprimierte der Knockdown von Inc-ITM2C-1 die GPR55 mRNA Expression in Huh-7.5 Zellen 12, 24 und 48 Stunden nach Behandlung mit HCV-RNA und Gapmers. Dies indizierte eine positive Regulation von GPR55 durch Inc-ITM2C-1. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass diese Regulation zu frühen Zeitpunkten (12, 24, 48 h nach HCV Transfektion) stattfand, während nach sechs Tagen diesem Effekt durch andere Mechanismen entgegengewirkt wird (Hu et al., 2019).

Verschiedene lncRNAs zeigten eine Beeinflussung der HCV Replikation, indem sie die antivirale Interferon-Antwort der Zellen veränderten (s. 1.1.7.4). Um dies für Inc-ITM2C-1 zu prüfen, wurde die Expression von vier ISGs nach HCV Transfektion und Knockdown der Inc-ITM2C-1 untersucht. Sowohl die alleinige Behandlung mit HCV-RNA als auch die Suppression der Inc-ITM2C-1 induzierten eine Hochregulation der ISGs. Dies wies auf eine indirekte negative Regulation der ISGs durch HCV und somit eine provirale Rolle der lncRNA für die HCV-Replikation hin. Diese Hochregulierung der ISGs durch Suppression der lncRNA fand zeitlich früher statt als die Suppression der HCV-RNA Level, was nahelegt, dass der Anstieg der ISGs zu einer Suppression der HCV Replikation führt. Ähnliche Effekte wurden bei Infektion von Huh-7.5 Zellen mit infektiösen HCV Partikeln beobachtet (Hu et al., 2019).

Zusammengefasst wird die Expression der Inc-ITM2C-1 durch HCV positiv reguliert, und Inc-ITM2C-1 hat wiederum selbst einen positiven Einfluss auf die HCV Replikation, indem es die antivirale Interferon-Antwort der Zellen reduziert. Inc-ITM2C-1 wurde nach Veröffentlichung der Ergebnisse von Hu et al. umbenannt und ist seitdem unter dem Namen „GCSIR“ (GPR55 cis regulatory suppressor of immune response RNA) gelistet (Hu et al., 2019).

1.2.1.2 GPR55 und HCV

Wie bereits in 1.2.1.1 beschrieben, zeigten Hu et al. (2019) eine Suppression der GPR55 mRNA Expression durch Suppression der Inc-ITM2C-1. Da ebenfalls die Expression der untersuchten ISGs negativ durch Inc-ITM2C-1 beeinflusst wurde, sollte die Korrelation zwischen GPR55 und ISGs untersucht werden. GPR55 wurde durch spezifische Gapmers für 48 h supprimiert, was zu einer Zunahme der Expression verschiedener ISGs führte. Somit könnte GPR55 die Verbindung zwischen Inc-ITM2C-1 und den ISGs darstellen, was in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt ist:

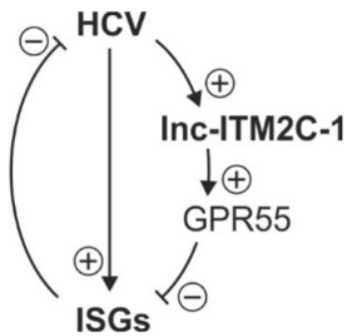


Abbildung 6: Modell zur Veranschaulichung einer möglichen Kaskade, wie Inc-ITM2C-1 und GPR55 die Replikation von HCV durch die negative Regulation von antiviralen ISGs fördern (Hu et al., 2019).

HCV induziert eine erhöhte Expression von Inc-ITM2C-1, was wiederum GPR55 hochreguliert. Durch bisher ungeklärte Signalwege werden daraufhin zelluläre ISGs supprimiert und somit eine provirale Umgebung für das Virus geschaffen. Grafik bearbeitet nach Hu et al., 2019 mit freundlicher Genehmigung der Autor*innen.

GPR55 wurde bisher in Bezug auf seine Rolle in der HCV-Infektion wenig untersucht. Bislang ist unklar, über welchen Mechanismus die GPR55 mRNA auf die Expression der ISGs in Huh-7.5-Zellen einwirkt. In verschiedenen anderen Bereichen der Wissenschaft hat GPR55 jedoch in den vergangenen Jahren zunehmendes Interesse erregt. Im Folgenden soll deswegen näher auf die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse bezüglich der Aktivierung, der Signalwege und der Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen eingegangen werden sowie das Expressionsprofil der GPR55 mRNA im Hinblick auf das Thema dieser Arbeit beleuchtet werden.

1.2.1.3 GPR55: Klassifizierung, Signalwege und (patho)physiologische Wirkung

Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 55 (GPR55) wurde 2007 als dritter Cannabinoidrezeptor beschrieben, nachdem beobachtet wurde, dass einige endogene, pflanzliche und synthetische Cannabinoide als Liganden durch Bindung einen GPR55-abhängigen Signalweg initiieren (Lauckner et al., 2008; Ryberg et al., 2007). Da neben den klassischen Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂ weitere Rezeptoren vermutet wurden, die beobachtete CB₁- und CB₂-unabhängige Effekte cannabinoider Liganden vermitteln (Ye et al., 2019), wurde GPR55 daraufhin in zahlreichen Rahmenbedingungen untersucht. Aufgrund von widersprüchlichen Studienergebnissen wird die Einordnung von GPR55 als Cannabinoidrezeptor jedoch immer noch kontrovers diskutiert (Pertwee et al., 2010; Petit et al., 2006; Ross, 2009; Yang et al., 2016; Ye et al., 2019).

Pharmakologisch wird GPR55 der Klasse A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren („Rhodopsin-ähnlich“) zugeordnet. Dabei wurde er lange in die Untergruppe der „orphan receptors“ eingeteilt, was so viel wie „verwaiste Rezeptoren“ bedeutet und darauf hinweist, dass lange Zeit kein eindeutiger und spezifischer Ligand für GPR55 definiert werden konnte (Alexander et al., 2017; Laschet et al., 2018). Das GPR55 Gen wurde auf Chromosom 2q37 lokalisiert und wird vom Reverse-Strang abgelesen (Sawzdargo et al., 1999). Strukturell hat GPR55 wenig Sequenzhomologie zu den Cannabinoidrezeptoren CB₁ (13,5 %) und CB₂ (14,4 %) (Petit et al., 2006; Ross, 2009). Hingegen

wurden Ähnlichkeiten zu P2Y5 (29 %), GPR23 (30 %), GPR35 (27 %) und CCR4 (23 %) festgestellt (Sawzdargo et al., 1999).

In Säugetieren wird GPR55 ubiquitär exprimiert, mit relativ hohem Expressionsprofil in Zellen des Immunsystems (Chiurchiù et al., 2015; Masquelier et al., 2018; Schicho et al., 2011; Wnorowski et al., 2021), Teilen des Gehirns (Sawzdargo et al., 1999), Geweben des Energiestoffwechsels, wie weißem Fettgewebe und β -Zellen des Pankreas (Amisten et al., 2013; Henstridge et al., 2016; McKillop et al., 2013; Romero-Zerbo et al., 2011; Simcocks et al., 2014), im Gastrointestinaltrakt (Galiazzo et al., 2018) sowie in zahlreichen Krebszelllinien und malignen Tumoren (Falasca und Ferro, 2016; He et al., 2015; Huang et al., 2011). In Leberzellen ist physiologisch dagegen keine erhöhte Expression der GPR55 mRNA beschrieben.

Neben verschiedenen Cannabinoiden (Lauckner et al., 2008; Ryberg et al., 2007) bindet der Rezeptor auch Peptide wie PACAP27 (Foster et al., 2019) und Lysoglycerophospholipide wie Lysophosphatidylinositol (LPI) (Henstridge et al., 2009; Oka et al., 2008, 2007). LPI ist ein Membranbestandteil, das mittlerweile als bioaktives Lipid und spezifischer endogener Agonist von GPR55 gilt (Alhouayek et al., 2018). Die stetige Entwicklung neuer synthetischer Agonisten und Antagonisten wird in Zukunft eine genauere Untersuchung der Wirkungsweisen des Rezeptors und seine potenzielle Rolle als therapeutisches Target ermöglichen (Jin et al., 2024). In unterschiedlichen Studien zeigten Substanzen teilweise widersprüchliches Verhalten am GPR55 Rezeptor mit variierenden Signalwegen (Pertwee et al., 2010; Ross, 2009). Bei den (Endo)Cannabinoiden wurde in unterschiedlichen Studien sowohl agonistisches als auch antagonistisches Verhalten der gleichen Substanz beobachtet. Diese Inkonsistenzen könnten durch unterschiedliche Zelllinien, Methoden oder Durchführung begründet sein. Gleichzeitig wird jedoch zunehmend vermutet, dass der Signalweg eines Rezeptors sowohl liganden- als auch systemabhängig variiert und eine Substanz somit in verschiedenen funktionellen Endpunkten entweder als Agonist oder als Antagonist dienen kann. Somit ist die Einstufung einer Substanz als Agonist oder Antagonist immer vom adressierten Endpunkt im Studiendesign abhängig (Ross, 2009).

In der Vergangenheit wurden verschiedene Signalwege ausgehend von GPR55 beschrieben. Eine gewisse Einigkeit besteht in der Erkenntnis, dass GPR55 nach Aktivierung G_q , $G_{\alpha 12}$ oder $G_{\alpha 13}$ bindet, was als Konsequenz zu Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern (Henstridge et al., 2009; Lauckner et al., 2008) und Aktivierung der Extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) führt (Oka et al., 2007). Weiterhin wurden in verschiedenen *in vitro* Experimenten die Beteiligung von kleinen G-Proteinen wie RhoA sowie der Phospholipase C (PLC) gezeigt (Henstridge et al., 2009; Ryberg et al.,

2007), die letztlich zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führten (Alhouayek et al., 2018; Falasca und Ferro, 2016).

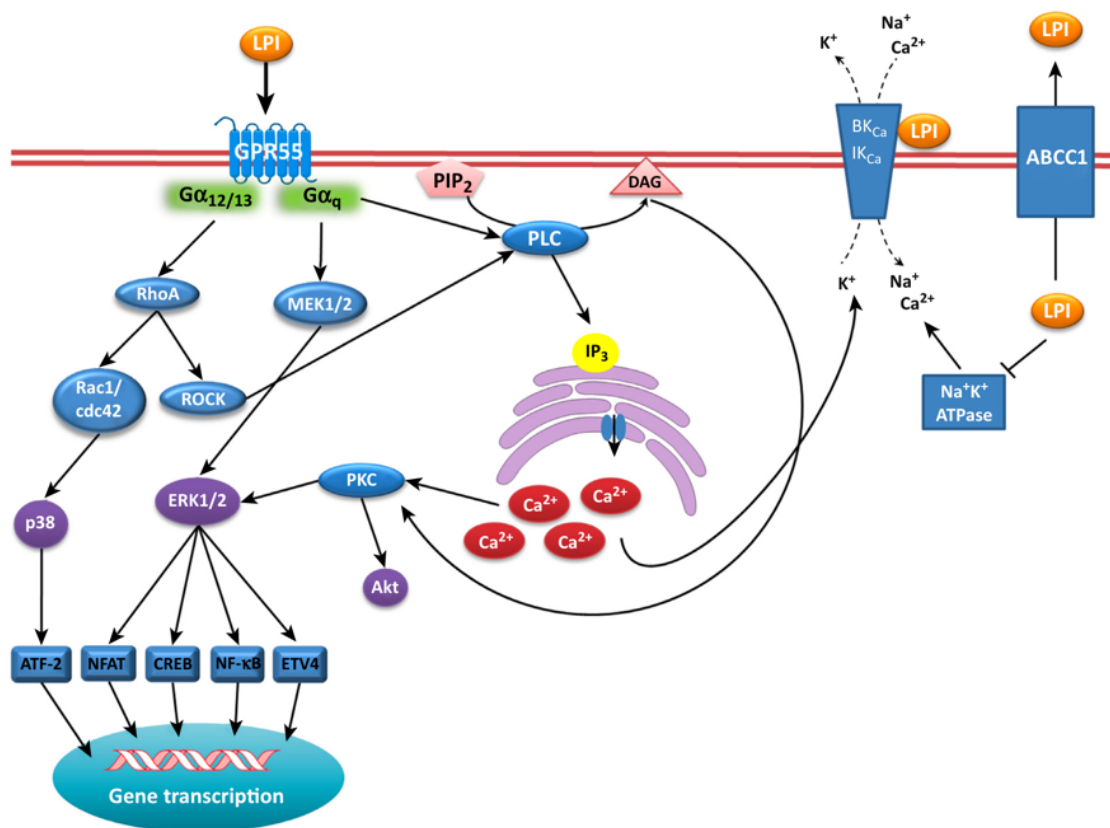


Abbildung 7: Signalwege von GPR55 und Lysophosphatidylinositol (LPI) (Alhouayek et al., 2018).

Grafik entnommen aus Alhouayek et al., 2018 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Auch die direkte Interaktion von GPR55 mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, insbesondere mit den Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂, wurde untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Heteromerisierung von GPR55 und CB₁ bzw. CB₂ Rezeptoren auf der Zelloberfläche zur Beeinflussung der jeweiligen Signalwege führt und durch Bindung des spezifischen Liganden der jeweils andere Rezeptor ebenfalls moduliert wird (Balenga et al., 2014; Kargl et al., 2012; Moreno et al., 2014).

Aufgrund seiner ubiquitären Expression wurde GPR55 als Bestandteil unterschiedlicher pathophysiologischer Prozesse untersucht.

GPR55 und seine Liganden werden mit der Pathophysiologie von Diabetes mellitus und Adipositas assoziiert. Die GPR55 Expression im viszeralen Fettgewebe ist positiv mit einem generell höheren Körperfettanteil korreliert, bei Diabetikern ist die GPR55 Expression im Fettgewebe am höchsten. Auch LPI Spiegel im Serum sind mit Körper-

fettanteil und Körpergewicht positiv korreliert (Henstridge et al., 2016). Auch die Fettakkumulation in Hepatozyten können durch eine GPR55 Aktivierung begründet sein (Jin et al., 2024). Eine Aktivierung des Rezeptors durch synthetische und endogene Cannabinoide (u. a. 2-Arachidonoylglycerol, Anandamid und O-1602) sowie LPI führte in den β -Zellen des Pankreas zu einem erhöhten Calciumeinstrom und einer Stimulation der Insulinsekretion (Amisten et al., 2013; Henstridge et al., 2016; Romero-Zerbo et al., 2011). Auch *in vivo* zeigten sich durch GPR55-Aktivierung insulinotrope und Glucose-senkende Effekte (McKillop et al., 2013). Durch den Einsatz des GPR55 Antagonisten ML193 wurden eine verbesserte Insulinresistenz beobachtet, weswegen GPR55 als potenzielles Target für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 diskutiert wird (Jin et al., 2024).

Obwohl GPR55 in Leberzellen geringer als in anderen Regionen des menschlichen Organismus exprimiert wird (s. u.), wird seine Rolle zunehmend im Hinblick auf die Leberzirrhose und zugrundeliegende Erkrankungen untersucht. Bei Patient*innen mit einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) zeigten sich erhöhte LPI Plasmawerte und eine erhöhte GPR55 mRNA und Protein Expression im Vergleich zu Patient*innen ohne Adipositas und Leberkrankung (Fondevila et al., 2021). Die GPR55 Aktivierung und LPI induzierten im Zellmodell eine Aktivierung von hepatischen Sternzellen (LX2-Zellen), die für die Synthese von Bindegewebe in der Leber verantwortlich sind und maßgeblich zur Entwicklung einer Leberfibrose und -zirrhose beitragen (Fondevila et al., 2021; Shi et al., 2024). Das zyklische Peptid P1-1 antagonisiert GPR55 und supprimiert so die Kollagenproduktion von hepatischen Sternzellen und somit die Fibroseprogression. Zudem zeigten sich durch die GPR55-Inhibition eine Reduktion von Sauerstoffradikalen, ER-Stress und Apoptose der Hepatozyten (Shi et al., 2024).

Auch einige Tumorerkrankungen werden zunehmend mit GPR55 und seinem Liganden LPI in Verbindung gebracht. Die Expression von GPR55 in menschlichen Tumoren unterschiedlicher Genese korrelierte in Untersuchungen mit der Aggressivität der malignen Erkrankung (hohe Proliferationsrate, schlechtere Prognose, geringe Differenzierung) (Andradas et al., 2011). Über eine Überaktivierung von ERK fördern LPI und GPR55 das Zellwachstum im Zellkultur- und im Mausmodell (Andradas et al., 2011). In Mammakarzinom-Patientinnen war die GPR55 Expression positiv mit der Metastasierungsrate von Triple-negativem Brustkrebs assoziiert, was u. a. zu verschlechterter Prognose führte (Andradas et al., 2016). GPR55 Expression ist auch in NSCLC (non small cell lung cancer) Zelllinien positiv mit Proliferation, Migration und Invasion assoziiert. Die miR-675-5p reduziert durch Bindung an die 3'-UTR der GPR55 mRNA diese Effekte (He et al., 2015). In Prostata- und Ovarialzellkarzinomen wird GPR55 auf mRNA-

und Protein-Ebene exprimiert und vermittelt nach Aktivierung durch LPI zellproliferative Effekte über Calciumausschüttung, Akt und ERK1/2. Dabei wurde eine autokrine Schleife beobachtet, wobei durch die zytosolische Phospholipase A2 LPI synthetisiert wird, welches durch den ATP-binding cassette transporter ABCC1/MRP1 in den Extrazellulärraum gepumpt wird, um von dort aus GPR55 zu aktivieren (Piñeiro et al., 2011). In Kolonkarzinomen herrscht eine hohe Expression von GPR55. Auch der Ligand LPI war in Kolonkarzinomen erhöht nachweisbar (Kitamura et al., 2021). Die Proliferation von Kolonkarzinom-Zelllinien wurde durch Aktivierung von überexprimiertem GPR55 gesteigert (Hasenoehrl et al., 2019). Hingegen korreliert in einer anderen Studie die GPR55 Expression in Lymphknoten bei primär operierten Kolonkarzinom-Patient*innen positiv mit der Prognose, weswegen die Bildung einer GPR55/CEA Ratio als prognostischer Faktor vorgeschlagen wurde. Die Autor*innen erklären ihre Beobachtungen damit, dass GPR55 vermehrt in Immunzellen wie B- und T-Zellen exprimiert wird, während die Expression in Tumorzellen vergleichsweise gering ausfällt. Ein hoher Anteil an Immunzellen neben einem geringen Anteil an metastasierten Tumorzellen im Lymphknoten führt demnach zu einer hohen GPR55/CEA Ratio und einer besseren Prognose (Ismail et al., 2022). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Studien wurde im cholangiozellulären Karzinom ein antiproliferativer und proapoptotischer Effekt nach GPR55-Aktivierung durch cannabinoide Agonisten beobachtet (Huang et al., 2011).

Die Datenlage zur möglichen Rolle von GPR55 im Immunsystem ist kontrovers. Es wird sowohl über Hoch- als auch über Herabregulation im Prozess der Immunaktivierung berichtet (Wnorowski et al., 2021; Yang et al., 2016). Vor allem bei der Aktivierung von Immunzellen wird eine Hochregulation von GPR55 beobachtet (Wnorowski et al., 2021) und in Zellen des angeborenen Immunsystems wurde eine höhere Expression von GPR55 detektiert als in Zellen des adaptiven Immunsystems (Chiurchiù et al., 2015). Die Stimulation des Rezeptors führte in einer Studie zu einer proinflammatorischen Antwort, die durch den Antagonisten Cannabidiol gehemmt werden konnte (Chiurchiù et al., 2015). Andererseits wurde in murinen Makrophagen-Zelllinien eine negative Korrelation zwischen GPR55 Expression und Ausmaß der Immunaktivierung nach Stimulation mit Lipopolysaccharid und LPI beobachtet, woraufhin LPI ein antiinflammatorisches Potenzial zugeschrieben wurde, was abhängig von der GPR55 Expression war (Masquelier et al., 2018). Wie auch CB₂ ist GPR55 an der Modulation von Neuroinflammation durch Beeinflussung der zentralen Mikroglia beteiligt (Pietr et al., 2009). LPI zeigte GPR55-abhängig eine neuroprotektive Wirkung in Mikroglia (Kallendrusch et al., 2013).

Im Bereich der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde die GPR55-Beteiligung an der Entwicklung von Entzündung von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. GPR55 zeigte eine höhere Expression in Darmbiopsien von M. Crohn Patient*innen im Vergleich zu Colitis ulcerosa Patient*innen (Włodarczyk et al., 2017). Im Mausmodell wurde GPR55 eine proinflammatorische Rolle zugeordnet, nachdem die Behandlung mit dem Antagonisten CID16020046 zu einer Reduktion von Kolitis in Mäusen und einer verringerten Makrophagen-Migration führte. In GPR55 Knockout Mäusen zeigten sich außerdem verringerte Entzündungs-Scores nach induzierter Kolitis als in den WT-Tieren (Stančić et al., 2015). In einer anderen Studie konnte hingegen durch das synthetische Cannabinoid O-1602, das sich als GPR55-Agonist erwiesen hatte, eine Reduktion von Kolitis und Neutrophilen-Recruitment erreicht werden. Dieser Effekt zeigte sich jedoch sowohl in CB₁/CB₂ Knockout-Mäusen als auch in GPR55 Knockout-Mäusen, was auf die Beteiligung weiterer Cannabinoid-bindender Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt hinweist (Schicho et al., 2011).

Zwar ist GPR55, wie auch CB₁, im zentralen Nervensystem exprimiert, jedoch zeigen sich in GPR55 Knockout-Mäusen keine Unterschiede bei physischen Charakteristika, Körpergewicht, synaptischer Übertragung, synaptischer Plastizität, neuronaler Erregbarkeit oder Konnektivität im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Wu et al., 2013). Einzig eine beeinträchtigte Bewegungskoordination und ein Ataxie-ähnlicher Phänotyp bei anspruchsvollen motorischen Übungen war in den GPR55 KO-Mäusen festzustellen (Wu et al., 2013). Darüber hinaus zeigte die Rezeptoraktivierung in Studien sowohl antinozizeptive (Guerrero-Alba et al., 2019) als auch pronozizeptive Wirkung (Staton et al., 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die vermittelten Signalwege als auch die Rolle der verschiedenen Cannabinoid-Liganden, neben LPI als endogenem Agonisten, noch nicht eindeutig identifiziert sind. Klar ist, dass der Rezeptor durch seine ubiquitäre Expression an zahlreichen verschiedenen (patho)physiologischen Prozessen im Körper beteiligt ist. Die teils widersprüchlichen Daten aus Studien zu Krebserkrankungen, Immunaktivierung, Stoffwechselprozessen und neurologischen Erkrankungen sind durch unterschiedliches Studiendesign und insbesondere Ergebnisdifferenzen zwischen *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien zu erklären. Deswegen ist es notwendig, weiterhin Untersuchungen zur Beteiligung von GPR55 an pathophysiologischen Prozessen voranzutreiben und dabei auch die Rolle in immunregulatorischen Prozessen, wie beispielsweise bei der Immunevasion des Hepatitis-C-Virus, weiter zu erforschen.

1.2.1.4 Expressionsprofil von GPR55

Die Aktivität des G-protein-coupled receptor 55 wurde bisher wissenschaftlich vor allem auf der Ebene des Proteins untersucht. In der Recherche zur mRNA-Expression, die in dieser Arbeit aufgrund von RNA-RNA-Interaktionen untersucht werden sollte, fiel auf, dass sowohl die GPR55 mRNA als auch das Protein in der verwendeten Zelllinie Huh-7 und generell in Lebergewebe relativ niedrig exprimiert war. Für die Recherche wurde u. a. der Human Protein Atlas verwendet, eine frei verfügbare Online-Ressource, in der Daten aus Protein Profiling mithilfe von Immunhistochemie sowie quantitativer Transkriptomanalyse Protein-codierender Gene mit RNA-Sequencing in menschlichen Geweben zusammengefasst sind. Verschiedene Kategorien der Darstellung beinhalten u. a. die mRNA- und Protein-Expression nach Gewebetyp, Zelltyp oder Zelllinie. Die Expression wird dabei meist in nTPM angegeben, was für „normalized transcript per million“ steht. Diese Einheit wird verwendet, um nach RNA-Sequencing Vergleiche zwischen der Expression von untersuchten mRNAs in unterschiedlichen Proben zu ziehen. Die Summe aller TPM Werte ist in allen Proben gleich, somit repräsentiert ein einzelner TPM Wert den relativen Anteil einer mRNA Expression, welche in allen Proben eines untersuchten Gewebes bzw. Zelltyps vergleichbar sein sollte (Y. Zhao et al., 2021). Es fiel auf, dass GPR55 mRNA in den Datensätzen des Human Protein Atlas vermehrt in Hodengewebe, Teilen des Gehirns und Organen des Immunsystems (Milz, Tonsillen, Lymphknoten, Appendix) detektiert wurde (Uhlén et al., 2015). Die nachgewiesene GPR55 mRNA Menge in Lebergewebe, insbesondere in Hepatozyten, fiel gering aus. In spezifischen Analysen zur Expression in einzelnen Zelltypen zeigte sich u. a. die vergleichsweise hohe Expression in Zellen des Immunsystems. In immortalisierten Leberzelllinien wurde nur eine sehr geringe Expression von GPR55 mRNA detektiert (Uhlén et al., 2015). Somit wurde ein erschwerter Nachweis der GPR55 mRNA in der verwendeten Hepatoma-Zelllinie Huh-7 angenommen. Daraus wurde für die Experimente in dieser Arbeit die Notwendigkeit einer hohen Integrität der extrahierten RNA, einer größtmöglichen Entfernung von kontaminierender DNA sowie einer spezifischen mRNA-Detektion mittels individueller und möglichst spezifischer Primer in der RT-qPCR abgeleitet.

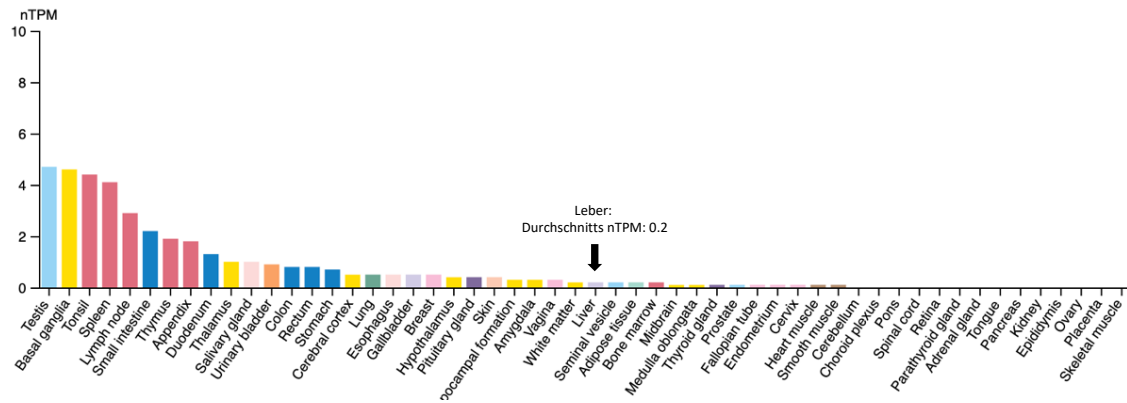


Abbildung 8: GPR55 mRNA Nachweis in menschlichen Geweben (Uhlén et al., 2015).

Daten aus dem Consensus Datenset der normalisierten Expressionslevel (nTPM) von 55 Gewebetypen, das auf den kombinierten Daten aus den Datensets des Human Protein Atlas (HPA) RNA-seq und des Genotype specific project (GTEx) basiert. nTPM = normalized transcript per million.

Grafik modifiziert mit freundlicher Genehmigung des Human Protein Atlas. Bildnachweis: Human Protein Atlas Version 22.0, www.proteinatlas.org (Uhlén et al., 2015). Das Diagramm ist unter der folgenden URL verfügbar: http://v22.proteinatlas.org/ENSG00000135898-GPR55/tissue#rna_expression, Download am 30.04.2023.

1.2.1.5 Interaktion zwischen *Inc-ITM2C-1* und *GPR55*

Hu et al. (2019) beobachteten, dass *Inc-ITM2C-1* im Rahmen einer HCV-Infektion in Huh-7.5 Zellen hochreguliert wird und einen positiv regulatorischen Effekt auf die Expression der *GPR55* mRNA ausübt, deren Gen benachbart zum Gen der *IncRNA* lokalisiert ist. Wie genau diese Interaktion abläuft, ist aktuell noch unklar, aber es ergab sich die Hypothese, dass *Inc-ITM2C-1* durch eine direkte Interaktion die *GPR55* mRNA regulieren könnte. Erste *in silico* Analysen zeigten mögliche RNA-RNA-Hybridisierungen (Grahn, 2022). Bei genauerer Recherche der Sequenzen fiel auf, dass verschiedene Spleißvarianten sowohl von *Inc-ITM2C-1* als auch von der *GPR55* mRNA in den bioinformatischen Datenbanken gelistet sind (Grahn, 2022).

Spleißen bezeichnet einen Vorgang bei der RNA-Prozessierung. Nachdem die sogenannte heterogene nukleäre RNA (hnRNA) als primäres Transkript entstanden ist, wird diese posttranskriptionell weiter modifiziert. U. a. werden dabei die nicht kodierenden Introns durch einen RNA-Protein-Komplex, das Spleißosom, entfernt und die kodierenden Exons zusammengefügt. Dabei können durch alternatives Spleißen aus einer hnRNA verschiedene reife mRNA Spleißvarianten entstehen. Bei 95 % der menschlichen Gene findet alternatives Spleißen statt, die verschiedenen Spleißvarianten sind oft gewebsspezifisch und tragen maßgeblich zur Komplexität des Transkriptoms und Proteoms bei (Wang et al., 2015).

2 Ziel der Arbeit

Noch immer besteht weltweit eine hohe Prävalenz von HCV-Infektionen und trotz der effektiven, aber teuren Behandlungsmöglichkeiten mit DAAs verursacht die chronische Infektion bis heute zahlreiche gesundheitliche Komplikationen. Die WHO setzte sich das Ziel, HCV bis zum Jahr 2030 zu eliminieren, was jedoch sowohl die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes als auch die weitere Erforschung der Interaktionen des Virus mit dem Wirtsmetabolismus voraussetzt.

lncRNAs wurden in den vergangenen Jahren zunehmend im Kontext von Virusinfektionen und dem Immunsystem untersucht. Im Kontext der HCV-Infektion wurden diverse pro- und antivirale lncRNAs identifiziert, die über verschiedene Mechanismen die virale Replikation, die zelluläre Immunreaktion und die Immunevasion des Virus beeinflussen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass lncRNAs u. a. über direkte RNA-RNA-Interaktion die Expression und Stabilität anderer RNAs regulieren können.

Nachdem Hu et al. 2019 beobachtet hatten, dass lnc-ITM2C-1 im Rahmen einer HCV-Infektion in Huh-7.5 Zellen hochreguliert wird und einen positiv regulatorischen Effekt auf die GPR55 mRNA ausübt, sollte anschließend untersucht werden, wie genau diese Interaktion abläuft. Da lncRNAs häufig durch direkte RNA-RNA- oder RNA-DNA-Interaktionen mit anderen Nukleinsäuren in der Zelle agieren, sollten dies nun untersucht werden. Erste *in silico* Analysen zeigten mögliche RNA-RNA-Hybridisierungen zwischen der lncRNA und der GPR55 mRNA. Dies führte zur Hypothese, dass die GPR55 mRNA durch eine solche RNA-RNA-Interaktion mit lnc-ITM2C-1 stabilisiert und dadurch langsamer abgebaut wird, was eine erhöhte intrazelluläre Expression von GPR55 zur Folge haben könnte.

Da in den Datenbanken diverse Spleißvarianten von lnc-ITM2C-1 und GPR55 mRNA gelistet sind, ist es notwendig, die tatsächlich exprimierten Spleißvarianten und ihre Sequenzen zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit werden die GPR55 mRNA Spleißvarianten untersucht. Dafür sollen Spleißvarianten-spezifische Primer für die RT-(q)PCR entwickelt werden. Aufgrund der niedrigen Expression der GPR55 mRNA ist es darüber hinaus nötig, die zelluläre RNA bei der Extraktion so weit wie möglich aufzureinigen, um eine Amplifikation von residualer DNA und somit eine Verfälschung der Ergebnisse in der (q)PCR zu vermeiden.

Für die Fortführung der Untersuchung der lnc-ITM2C-1 - GPR55 - ISG Regulationsachse sollen in den Experimenten Huh-7 Zellen verwendet werden. Diese Zellen besitzen eine weitgehend intakte antivirale Immunantwort im Vergleich zu Huh-7.5 Zellen, die aufgrund einer Beeinträchtigung des RIG-I Signalwegs sehr permissiv für eine HCV Replikation

sind. Zudem soll der Fokus auf die frühen Effekte auf die GPR55 mRNA Expression nach einer HCV Transfektion (bis 48 h) gelegt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Kryoröhrchen CryoPure Röhren	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 - 1250 µl)	Sarstedt
Qubit™ Assay Tubes	Invitrogen
SafeSeal Reagiergefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Schraubröhren (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten (5 ml - 50 ml)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25 cm ² - 175 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6 well)	Sarstedt

3.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklave, V-150	Systemec
Bi-Destille, Destamat	Heraeus
CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder GmbH
Duomax 1030 (5° Neigungswinkel)	Heidolph Instruments
Fluorometer Qubit™	Invitrogen
Gelelektrophoresekammern (Agarosegel)	Von Keutz Labortechnik
Geldokumentationssystem, Geldoc XR	Bio-Rad
Gießkassette für Acrylamidgele	Bio-Rad
Heizblock MBT 250	Kleinfeld Labortechnik
Heizblock, Accublock™ Digital Dry Bath (2 ml Reaktionsgefäße)	Labnet International, Inc.
Heizblock, PeqLab (1,5 ml Reaktionsgefäße)	PeqLab Biotechnologie GmbH
Kühlzentrifuge 5427R	Eppendorf
Mikroskop, Leica DM IL invers	Leica Microsystems

Mikrowelle	Severin
Minizentrifuge MiniStar	VWR
Netzteil für Elektrophorese	Bio-Rad
Ofen	Binder
PCR Workstation	VWR
pH-Meter, digital	Knick
Pipetboy	Integra
Pipetten (2 µl - 1000 µl)	Gilson
Qubit® 2.0 Fluorometer	Invitrogen
Sterile Bank, Lamin Air HA 2448 BS	Heraeus
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad
Thermocycler (TProfessional, T1)	Biometra
Tischzentrifuge, Fisher AccuSpin Micro 17	Thermo Fisher Scientific
Vortex Genie 2™	Bender & Hoben
Waage L 2200 5	Sartorius
Zählkammer, Neubauer-improved (0,1 mm)	Superior Marienfeld

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS 10 %)	Serva
Borsäure, ≥ 99,8 %	Carl Roth
Chloroform	Carl Roth
Doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O)	Eigenherstellung in Bi-Destille
Ethanol reinst 96 %	Carl Roth
Ethanol vergällt, ≥ 99,6 %	Carl Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth
GlycoBlue	Thermo Fisher Scientific
Isopropanol, ≥ 99,5 %	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
MgCl₂, 25 mM	Thermo Fisher Scientific

MgCl₂, 50 mM	NEB
Milchpulver	Carl Roth
Natriumacetat, ≥ 99 %	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumhydrochlorid	Carl Roth
Phenol/Chloroform, pH 4,5, mit IAA, 125:24:1 (AM9720)	Thermo Fisher Scientific
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, pH 4-5 (77619)	Merck
Purple Loading Dye 6X	NEB
RNA Loading Dye, 2X	Thermo Fisher Scientific
ROTI® Aqua-P/C/I (Aqua-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol), pH 4,5-5 (X985.1)	Carl Roth
ROTI® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (A156.2)	Carl Roth
ROTIPHORESE® Gel 30 (29:1)	Carl Roth
ROTIPHORESE® Gel 40 (29:1)	Carl Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth
TRIzol	Thermo Fisher Scientific
Trypsin, 2,5 % Trypsin 10X	Thermo Fisher Scientific
Tween 20	Carl Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

3.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer	Endkonzentration	Ansatz
APS 10 %	10 %	1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml ddH ₂ O
Blocking-Lösung		2,5 g Milchpulver 50 ml PBST 0,3 %
DTT	1 M	Für 10 ml: 1,5 mg Auffüllen mit ddH ₂ O
EDTA	0,5 M	Für 100 ml:

		14,61 g Auffüllen mit ddH ₂ O
Laemmli Puffer	4X	1,6 ml Glycerol 2 ml 0,5 M Tris pH 6,8 800 µl beta-Mercaptoethanol 3,2 ml 10 % SDS 400 µl 2 % Bromphenolblau Bei -20 °C lagern
Natriumacetat	3 M	Für 100 ml: 24,6 g Auffüllen mit ddH ₂ O
PBS	10X	Für 1 l: 80 g NaCl 2 g KCl 26,8 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 2,8 g KH ₂ PO ₄ In 800 ml ddH ₂ O auflösen pH 7,4 mit HCl adjustieren Auffüllen mit ddH ₂ O
PBS	1X	Für 1 l: 100 ml 10X PBS Auffüllen mit ddH ₂ O
PBST 0,1 %	0,1 %	100 ml PBST 0,3 % 200 ml 1X PBS
PBST 0,3 %	0,3 %	500 ml 1X PBS 1,5 ml Tween® 20
PMSF (Proteinase Inhibitor)	2,5 mM	0,871 g in 50 ml Isopropanol
RIPA Puffer		100 µl Triton X-100 0,6 g Tris-HCl (pH 8,0) 500 ml ddH ₂ O 0,87 g NaCl 1 ml SDS 10 % 0,5 g Sodium Deoxycholate (0,5 %)

		2 ml EDTA (0,5 M) 100 µl NaF (1 M) 98,8 ml ddH ₂ O
TAE-Puffer	1X	Für 1 l: 20 ml 50X TAE Auffüllen mit ddH ₂ O
TAE-Puffer (Tris-Acetat)	50X	Für 1 l: 242 g Tris 100 ml 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0) 57,1 ml Eisessigsäure Auffüllen mit ddH ₂ O
TBE-Puffer	1X	Für 1 l: 100 ml 10X Auffüllen mit ddH ₂ O oder autoklaviertem VE-Wasser
TBE-Puffer (Tris-Borat)	10X	Für 1 l: 108 g 89 mM Tris-Base 55 g 89 mM Borsäure 40 ml 2 mM EDTA Auffüllen mit ddH ₂ O
Transfer Puffer	10X	Für 2 L: 60,55 g Tris 288 g Glycin Auffüllen mit ddH ₂ O
Transfer Puffer	1X	100 ml of 10X 700 ml ddH ₂ O 200 ml Methanol
Tris pH 6,8	0,5 M	12 g Tris in 120 ml ddH ₂ O pH einstellen: 6.8 Auffüllen mit ddH ₂ O auf 200 ml (80 ml)
Tris pH 8,8	1,5 M	36.3 g Tris 120 ml ddH ₂ O pH einstellen: 8.8 Auffüllen mit ddH ₂ O auf 200 ml (80 ml)

Tris-Glycin Running-Puffer	10X	Für 4 L: 121,1 g Tris 576 g Glycin 200 ml 20 % SDS (40 g in 200 ml in ddH ₂ O) Auffüllen mit ddH ₂ O
Tris-Glycin Running-Puffer	1X	100 ml 10X 900 ml ddH ₂ O
Trypsin	1X (0,25 %)	Für 50 ml: 5 ml 10X Trypsin 2,5% Auffüllen mit 1X PBS

3.1.5 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
Anti-GAPDH Antikörper	Ein muriner monoklonaler Antikörper für das zytoplasmatische Haushaltsprotein GAPDH	Abcam
Anti-Hepatitis-C-Virus NS3 Antikörper 8 G-2	Ein muriner monoklonaler Antikörper für HCV NS3, der effizient auf den JFH-1 Stamm (Genotyp 2a) reagiert.	Abcam
Anti-Maus IgG HOR Antikörper, konjugiert mit Peroxidase	Sekundärantikörper, der über die enzymatische Reaktion der Horseradish-Peroxidase durch Chemilumineszenz detektiert wird	Sigma-Aldrich

3.1.6 Enzyme

Enzym	Puffer	Hersteller
Maxima Reverse Transcriptase	Maxima RT Puffer	Thermo Fisher Scientific
Mlu1	rCutSmart Puffer	NEB
Phusion Polymerase	Phusion Puffer	NEB
Proteinase K	-	NEB

qScript Reverse Transkriptase	5X RT Puffer	QuantaBio
RNase Inhibitor Murine	-	NEB
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	-	Bio-Rad
T7 RNA Polymerase	RNA Pol Reaktionspuffer	NEB
Taq-Polymerase	Taq Puffer + (NH ₄) ₂ SO ₄ , - MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific
TURBO DNase	TURBO DNase Puffer	Thermo Fisher Scientific

3.1.7 Kit-Systeme

Kit	Hersteller
Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent	Cytiva
GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific
Invitrogen PureLink Genomic DNA MiniKit	Thermo Fisher Scientific
Monarch RNA Clean Up Kit	New England Biolabs
qScript Flex cDNA Kit	Quanta Biosciences
Qubit™ Assay Kits	Thermo Fisher Scientific

3.1.8 Nukleotide und Oligonukleotide

3.1.8.1 Nukleotide

Nukleotide	Hersteller
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) 100 mM	Carl Roth
Ribonukleosidtriphosphate (rNTPs) 100 mM	Carl Roth

3.1.8.2 RNA-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Hersteller
miR-122 mat	pUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	Biomers
miR-122*	pAACGCCAUUAUCACACUAAAUA	Biomers

3.1.8.3 DNA-Oligonukleotide

Nr.	Alternativer Name	Sequenz 5'-3'	Design; Hersteller
1	GPR55 Exon 1 fwd	GAAATGACATCTCTCAGCCCTC	Elena Jost; Biomers
2	GPR55 variant 2 unique fwd	AACAGCCTCTGGGCCATTTAGAGA	Nikolai Grahm; IDT
3	GPR55 Exon 2 rev (variant 3 unique rev)	GGGATGTGGACTGCAAAGTGTAGG	Nikolai Grahm; Biomers
4	GPR55 variant 3 unique fwd	GCCTTTCTCTTTTTCTCCCCGA	Nikolai Grahm; IDT
5	GPR55 variant 3 rev 1s (Helping Primer 5 rev)	GCTGGAGGCTGAGTGTGGGC	Elena Jost; Biomers
6	GPR55 variant 3 rev 2s (Helping Primer 7 rev)	CAAAGGACACTGCCTTACCAGG	Elena Jost; Biomers
7	GPR55 conserved NG fwd	AAGAGAGTGAAAGGAGCCCCGTCT	Nikolai Grahm; IDT
8	GPR55 conserved Pan Hu fwd	GAAAACCCTACAGTTTGCAGTCC	PrimerBank; Biomers
9	GPR55 conserved Pan Hu rev	GAGGTGGCAGCATAATCGGG	PrimerBank; Biomers
10	GPR55 conserved Primer Bank 1 fwd	GGTGGAGTGCCTTTACTTCGT	PrimerBank; Biomers
11	GPR55 conserved Primer Bank 1 rev	CAGTAGCGGGTAACGGATGG	PrimerBank; Biomers
12	GPR55 conserved Primer Bank 2 fwd	GGACCGGAAGCATCCCTATCT	PrimerBank; Biomers
13	GPR55 conserved Primer Bank 2 rev	CGCTCCAGGTATCATCAGACA	PrimerBank; Biomers
14	GPR55 Exon-Exon Primer 1	CCACCAACAGTTGTGATTCAATGGGC	Elena Jost; Biomers

15	GPR55 variant 9 unique fwd	CATTTTCCTGTTCGACTGGGAGGTTTC	Nikolai Grahm; IDT
16	GPR55 Exon-Exon Primer 8/9	GAGAGAGAGAGAAAAGAGGTGGATGG	Elena Jost; Biomers
17	GPR55 Intron Primer 8/9	CAGCTGGCCTAAGAGCCATGGAC	Elena Jost; Biomers
18	GPR55 3'-end rev	TCTGTGGCTGTGGTTCTTAGAGG	Elena Jost; Biomers
19	GPR55 variant 4 unique 1	CTTGTTCCCTTGCCCTAGAAGAAGC	Elena Jost; Biomers
20	GPR55 variant 4 unique 2	GCTGCTCCACTGGTGAAGTCGAAG	Elena Jost; Biomers
21	GPR55 variant 3 unique RT long	ATGGAGGTGGCAGCATAATCGGG	Nikolai Grahm; IDT
22	GPR55 conserved NG rev long	GGAAGGAGGAAGCCAAACACCTC	Nikolai Grahm; IDT
23	GPR55 conserved NG RT long	GGAGGAAGGAGACCACGAAGAC	Nikolai Grahm; IDT
24	GPR55 longcon- served NG fwd	AGCCTGCATCTACAGCATCGCA	Nikolai Grahm; IDT
25	GPR55 longcon- served NG rev	GGTGGTATAAGCTGTCTGGGCAGT	Nikolai Grahm; IDT
26	GPR55 longcon- served NG RT	TCTTTCCAGAACCTCCCAGTCGAAC	Nikolai Grahm; IDT
27	GPR55 variant 9 unique rev long	AGCTATGTGGGTCCAAACTCTCGG	Nikolai Grahm; IDT
28	GPR55 variant 9 unique RT long	TTTTTCCAAAGCTAACCGTCCGCC	Nikolai Grahm; IDT
29	GPR55 Helping Primer 1 rev	CACTCGTAATCGGGGACAAACC	Elena Jost; Biomers
30	GPR55 Helping Primer 2 rev	AACAAGATTCTGGGGAATGGGC	Elena Jost; Biomers
31	GPR55 Helping Primer 3 rev	TCAGGAGGAAGTTGAGGGTTCG	Elena Jost; Biomers

32	GPR55 Helping Primer 4 fwd	GGGTCTGGGTATGTGCTGTTAC	Elena Jost; Biomers
33	GPR55 Helping Primer 5 rev (HP 4.1)	TGAAACTTCTCCCCCTAGTCCTGC	Elena Jost; Biomers
34	GPR55 Helping Primer 6 rev (HP 4.2)	CCTTGCCAAGATACGTCTCCAG	Elena Jost; Biomers
35	GAPDH fwd	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	Pan Hu, Biomers
36	GAPDH rev	GATCTCGCTCCTGGAAGATG	Pan Hu, Biomers

3.1.9 Plasmid

Plasmid	Hersteller
pFK-JFH1-J6 C-846_dg (JC1)	Pietschmann et al., 2006

3.1.10 Größen- und Längenstandards

Standard	Hersteller
Color Protein Standard Broad Range	NEB
GeneRuler Low Range	Thermo Fisher Scientific
Hyperladder 1 kb	Meridian Bioscience

3.1.11 Zelllinie

Zelllinie	Eigenschaften
Huh-7	Humane, von Hepatozyten abgeleitete adhären wachsende Karzinomzelllinie, 1982 entnommen aus dem Lebertumor eines 57-jährigen japanischen männlichen Patienten. U. a. tragen sie eine Mutation im p53 Gen.

3.1.12 Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Carl Roth
DMEM mit 10 % HI-FBS + 1 % nicht-essenzielle Aminosäuren	500 ml DMEM versetzt mit: 10 % (50 ml) hitzeinaktiviertem FBS, 1 % (5 ml) Penicillin/ Streptomycin, 1 % (5 ml) nicht-essenzielle Aminosäuren	
Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM)	Hoher Glukosegehalt (4,5 g/l), L-Glutamin, Pyruvat, Phenol Rot	Thermo Fisher Scientific
HI (Hitze-inaktiviertes) FBS	Fötales Kälberserum, erhitzt bei 55 °C für 30 min	Life Technologies
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Glycin, L-Alanin, L-Asparagin, L-Aspartat, L-Glutamat, L-Prolin, L-Serin, jeweils 10 mM	Life Technologies
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	5000 Units/ml Penicillin 5000 Units/ml Streptomycin	Life Technologies

3.1.13 Computerprogramme

Programm	Hersteller
CFX Maestro	Bio-Rad
CorelDRAW	CorelDRAW
GraphPad PRISM	GraphPad
Image Lab	Bio-Rad
Microsoft Word für Mac	Microsoft
Quantify	Bio-Rad
SnapGene	Dotmatics
Zotero	Digital Scholar

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Arbeiten mit Zellen

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Zelllinie Huh-7 verwendet. Dies ist eine adhären wachsende humane Zelllinie, die von Hepatozyten abgeleitet ist und 1982 aus dem Lebertumor eines 57-jährigen japanischen männlichen Patienten entnommen wurde, u. a. tragen die Hepatomazellen eine Mutation im p53 Gen.

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Diese wurde 30 Minuten vor Benutzung durch UV-Licht sterilisiert sowie durch eine stetige Luftzirkulation gereinigt. Außerdem wurden die Oberflächen sowie unter die Bank eingebrachte Behältnisse und Materialien mit 70%igem Ethanol desinfiziert und es wurde mit Nitrilhandschuhen gearbeitet. Alle verwendeten Materialien waren steril verpackt bzw. hausintern autoklaviert. Die verwendeten Lösungen wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur bzw. im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

3.2.1.2 Auftauen eukaryotischer Zellen

Für die langfristige Aufbewahrung wurden die verwendeten Zelllinien in einem Stickstofftank eingefroren. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen in 500 µl Aliquots gelagert. Diese wurden nach Entnahme auf Eis transportiert und anschließend in einem 37 °C warmem Wasserbad für 1 min aufgetaut. Zu jedem Kryoröhrchen wurden 500 µl Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM), versetzt mit 10 % hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) sowie 1 % nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA), hinzugefügt. Die Zellen wurden im Medium vorsichtig auf- und abpipettiert und anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde bei 4 °C bei 9000 x g (9205 rpm) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Zellpellet in 10 ml DMEM (10 % FBS, P/S, NEAA) durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Wieder wurde die Zelllösung bei 4 °C und 9000 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 12 ml DMEM (10 % FBS, P/S, NEAA) vorsichtig resuspendiert und anschließend in eine T25 (25 cm²) Zellkulturflasche überführt. Durch vorsichtige horizontale Bewegungen wurden die Zellen gleichmäßig auf dem Boden der Flasche verteilt und zum Adhären und Wachsen in den Inkubator gegeben. Nach ein bis zwei Tagen, wenn die Zellen die Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in eine größere Zellkulturflasche (T75, 75 cm²) überführt.

3.2.1.3 Kultivierung und Splitten eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C, hoher Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Sättigung im Inkubator kultiviert und je nach Zelllinie alle 2 - 5 Tage passagiert, sobald sie zu 90 - 100 % konfluent gewachsen waren, um ein Überwachsen der Zellen zu verhindern.

Beim Passagieren wurde zunächst das alte Medium mit dem PipetBoy entfernt und verworfen. Die Zellen wurden im Anschluss mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (5 ml für T175-Zellkulturflaschen, 3 ml für T75-Zellkulturflaschen) gewaschen und das PBS daraufhin verworfen. Um die adhärennten Zellen vom Boden der Flasche zu lösen, wurden sie mit 3 ml (T75) bzw. 4 ml (T175) 0,5%igem Trypsin für 5 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden restliche adhärenierende Zellen durch vorsichtiges Schwenken und leichtem Beklopfen der Zellkulturflasche gelöst und die enzymatische Reaktion des Trypsins durch Zugabe von DMEM (10 % HI-FBS, P/S, NEAA) beendet. Hierfür wurde der Zelllösung DMEM (10 % HI-FBS, P/S, NEAA) zugegeben, bis 10 ml Totalvolumen erreicht waren (6 ml bei T175, 7 ml bei T75). Die Zellsuspension wurde wiederholt auf- und abpipettiert, um Zellkonglomeratbildung zu verhindern und die Zellen vollständig vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Anschließend wurden je nach gewünschter Teilung, beispielsweise bei einer Passage von 1:10, 90 %, also 9 ml, der Zelllösung entnommen und entweder für weitere Experimente in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt oder verworfen. Die restlichen 10 %, im o. g. Fall 1 ml, wurden in der Zellkulturflasche belassen und mit DMEM (10 % HI-FBS, P/S, NEAA) auf das Totalvolumen der Flasche aufgefüllt. Durch vorsichtige 8-förmige horizontale Bewegungen wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Flasche gewährleistet. Die gesplitteten Zellen wurden daraufhin wieder in den Brutschrank gegeben und nach 4 - 5 Tagen, wenn wieder die Konfluenz erreicht war, für weitere Experimente oder Passagieren verwendet.

3.2.1.4 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer improved Zählkammer

Im Rahmen des Aussäens von Zellen wurden diese zunächst gezählt, um sicherzustellen, dass die folgenden Experimente regelmäßig mit einer konstanten Anzahl an Zellen durchgeführt werden konnten. Die Neubauer improved Zählkammer bietet die Möglichkeit, die Zellen mithilfe eines Zählgitters unter dem Lichtmikroskop zu zählen. Sie besteht aus einer Glasplatte mit einem Deckglas. Das Zählgitter besteht aus 3 x 3 Großquadraten von je 1 mm Kantenlänge, die wiederum jeweils in 4 x 4 Quadrate mit 0,25 mm Kantenlänge unterteilt sind. Die Kammerhöhe beträgt nach Auftragen des Deckglases 0,1 mm, sodass ein Großquadrat ein Volumen von 0,1 mm³ (0,1 µl) besitzt. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die adhärennten Zellen mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurden die Zellen in DMEM (10 %

HI-FBS, P/S, NEAA) gründlich resuspendiert und wie zuvor beschrieben gesplittet und passagiert, während die restliche Zellsuspension in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurde.

Nach Desinfizieren der Neubauer-Zählkammer mit 70%igem Ethanol und Auflegen des Deckglases wurden 10 µl der Zelllösung unter das Deckglas appliziert und die Zählkammer wurde so unter dem Mikroskop platziert, dass das zentrale Gittermuster der 3 x 3 Großquadranten sichtbar war. Die Zellen wurden nun in den vier Eckquadranten gezählt. Dabei wurden Zellen, die auf den Außenbegrenzungen der Quadrate lokalisiert waren, nur links und oben, aber nicht rechts und unten berücksichtigt. Aus diesen Zellzahlen wurde ein Mittelwert gebildet. Der ermittelte Wert wurde mit 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Der Multiplikationsfaktor von 10^4 ergibt sich aus dem Volumen der gezählten Abschnitte, die jeweils $0,1 \text{ mm}^3$ betragen. In 1 ml Zellsuspension befindet sich folglich der Mittelwert der gezählten Zellen mit 10^4 multipliziert.

$$\frac{\text{Totale Zellanzahl}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert der vier Quadranten} \times 10.000$$

3.2.1.5 Aussäen eukaryotischer Zellen

24 - 48 h bevor die Zellen für experimentelle Methoden verwendet werden konnten, wurden sie auf 6-Well-Kulturplatten ausgesät. Pro Well wurden $0,4 - 0,5 \times 10^6$ Zellen benötigt, damit diese innerhalb von 24 - 48 h konfluent wachsen, jedoch nicht überwachsen konnten. Hierfür wurde wie zuvor beschrieben die Zellzahl mithilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt und mit folgender Formel das benötigte Volumen an Zellsuspension für ein Well berechnet:

$$\text{Benötigte Zellsuspension pro Well } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Gewünschte Zellzahl pro Well}}{\text{Ermittelte Zellzahl aus Neubauer-Zählkammer}} \times 1000 \mu\text{l}$$

Das berechnete Volumen an Zelllösung wurde daraufhin in die Wells pipettiert und jedes Well bis zu einem Gesamtvolumen von 2 ml mit DMEM (10 % HI-FBS, P/S, NEAA) aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mithilfe von horizontalen 8-förmigen Bewegungen gleichmäßig verteilt und im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.1.6 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Sobald die Zellen in absehbarer Zeit nicht für Experimente benötigt wurden, empfahl es sich, sie einzufrieren, um unnötiges Passagieren und somit Altern der Zellen mit daraus folgender genetischer Veränderung sowie Materialverschwendung zu verhindern.

Zuerst wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden je nach Flaschengröße 3 - 5 ml

Trypsin appliziert und für 5 - 6 min im Brutschrank inkubiert. Pro T75 Zellkulturflasche wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen 3,5 ml einer DMEM/DMSO Lösung mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

- 3150 µl DMEM (10 % HI-FBS, P/S, NEAA)
- 350 µl DMSO

Nachdem die Zellen durch das Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst waren, wurde die Reaktion mit 10%igem DMEM beendet und durch Auf- und Abpipettieren ein Agglutinieren der Zellen verhindert. Die 10 ml Zelllösung wurde anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 4 °C und 9000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Zellpellet im Anschluss in 3,5 ml der DMEM/DMSO-Lösung durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. In jedes Kryoröhrchen wurden daraufhin 500 µl der Zellsuspension aliquotiert. Die befüllten und beschrifteten Kryoröhrchen wurden in ein Ethanol-Einfriergerät gestellt, das eine kontinuierliche Abkühlung der Röhrchen um 1 °C/min sicherstellt. Das Einfriergerät mit den enthaltenen Kryoröhrchen wurde 24 Stunden bei -40 °C gelagert und anschließend zur langfristigen Lagerung in den Stickstofftank überführt.

3.2.1.7 Transfektion mit Lipofectamine 3000

Die Transfektion hat das Ziel, RNA oder DNA in eukaryotische Zellen einzubringen. Man unterscheidet zwischen transienter und stabiler Transfektion, wobei in dieser Arbeit nur die transiente Transfektion angewendet wurde. Die Experimente mit HCV-RNA wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe BSL3** durchgeführt.

Zunächst wurde eine Transfektion von 500 ng miRNA-122-Duplex bei 70%iger Konfluenz der Zellen vorgenommen. Die miRNA-122 ist ein wichtiger proviraler Faktor in Leberzellen für eine erfolgreiche HCV Replikation, weswegen sie den Zellen für optimale Bedingungen zugegeben wurde. 24 h später erfolgte die Co-Transfektion der HCV-RNA mit miRNA-122 bzw. der Negativ-Kontrolle („mock“), die lediglich miRNA-122 enthielt.

Für die Transfektion der HCV-RNA wurden zwei Mastermixe vorbereitet. Mastermix 1 (MM 1, in 15 ml Reaktionsgefäßen) enthielt die RNA (HCV-RNA + miRNA122 bzw. mock) sowie Opti-MEM. Mastermix 2 (MM 2, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen) enthielt Opti-MEM und Lipofectamine 3000. Dabei bestand immer ein Verhältnis von RNA zu Lipofectamine von 1:3. Die genauen Volumina ergaben sich nach Berechnung der Konzentration. Die Mastermixe wurden jeweils für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde MM 2 in die jeweiligen 15 ml Reaktionsgefäße hinzugefügt und die Lösung durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 15 min inkubiert. Das alte Medium

wurde von den Zellen (in 6-Well-Platten) verworfen und jeweils 1 ml des Transfektionsansatzes (Lipofectamine + RNA + Opti-MEM) pro Well hinzugefügt. Dabei war mindestens jeweils ein Well für die RNA-Extraktion und eins für den Western Blot vorgesehen. Durch horizontale Bewegungen wurden die Zellen gleichmäßig mit der Lösung bedeckt und für 48 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach 48 h erfolgte die RNA-Extraktion (s. 3.2.2.2) oder die Protein-Extraktion (s. 3.2.4). Mittels Western Blot wurde das erfolgreich translatierte NS3-Protein in den transfizierten Zellen nachgewiesen (s. 3.2.4.3).

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Arbeiten mit RNA

Beim Arbeiten mit RNA ist zu beachten, dass RNasen ubiquitär vorkommen und nicht wie andere Enzyme durch Autoklavieren vollständig inaktiviert werden können. Verwendete Materialien wurden speziell präpariert und nur für die Arbeit mit RNA verwendet. Glaswaren und Spatel wurden bei 260 °C für 6 Stunden gebacken und Reaktionsgefäße zusätzlich zur Herstellerangabe „RNase-frei“ autoklaviert und getrocknet. Alle Arbeiten mit RNA wurden an einer sterilen Bank mit stetiger Zirkulation vorgenommen. Oberflächen und Materialien wurden vor Gebrauch an der sterilen Bank mit 70%igem Ethanol und mit RNaseZap (Thermo Fisher Scientific) desinfiziert.

3.2.2.2 RNA-Extraktion

Um die Genexpression und -transkription in den Zellen zu untersuchen, wurde eine Extraktion der Gesamt-RNA vorgenommen. Die Optimierung dieses Protokolls mit methodischem Hintergrund ist in Kapitel 4.1 beschrieben.

Die Zellen wurden 24 h vor der Extraktion in 6-Well-Platten ausgesät und bei 90 - 100%iger Konfluenz lysiert. Das alte Medium wurde entnommen, 1 ml TRIzol-Lösung pro Well hinzugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das entstehende Zelllysate wurde gründlich 4- bis 5-mal auf- und abpipettiert, um alle Zellen vom Boden der Well-Platte zu lösen und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß, kurz „Eppi“, überführt. Dort wurde die Zelllösung erneut 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden pro Eppendorf-Reaktionsgefäß 200 µl 4 °C kaltes Chloroform hinzugefügt, 30- bis 40-mal invertiert und wiederum 3 - 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden im Anschluss in der Eppendorf-Zentrifuge bei 4 °C für 20 min und 16.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurden 400 µl des hydrophilen Überstands, der die RNA enthielt, vorsichtig abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dabei ist besonders wichtig, die Interphase und die 3 - 4 mm

des Bereichs oberhalb der Phasengrenze auszusparen, um ein Überpipettieren von DNA und Zellbestandteilen zu verhindern.

Für die folgende saure Phenol-Chloroform-Extraktion wurden zunächst dem entnommenen Überstand 400 µl saures Phenol (pH 4,5) hinzugefügt, das Gemisch im Reaktionsgefäß 30- bis 40-mal invertiert und anschließend bei 4 °C für 10 min bei 16.000 rpm zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit der gleichen Menge Chloroform versetzt. Das Gemisch wurde 30- bis 40-mal invertiert und im Anschluss 5 min bei 4 °C und 16.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge kaltem 96%igem Ethanol versetzt. Die Lösung wurde durch Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt und daraufhin auf eine NEB Monarch Kit Säule gegeben. Anschließend folgte die RNA-Aufreinigung mithilfe der Säule den Anweisungen des Herstellers folgend. Die RNA wurde abschließend in 20 oder 25 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

3.2.2.3 Herstellung von saurem Phenol-Chloroform

Im Rahmen des Vergleichs von Qualität und Effektivität in der Entfernung genomischer DNA während der RNA-Extraktion wurde u. a. Phenol-Chloroform im Haus auf einen pH von 4,5 justiert. Dies wurde durch wiederholtes Equilibrieren der Phenol-Chloroform-Phase mit saurem Natriumacetat erreicht. Dafür wurde zunächst 3 M Natriumacetat pH 5,5 mit ddH₂O auf 0,05 M verdünnt. Anschließend wurde der pH-Wert dieses Natriumacetats mit Essigsäure (96 %) vorsichtig auf pH 4,5 justiert. Dazu wurden 20 ml Phenol mit 20 ml des pH-justierten Natriumacetat (0,05 M; pH 4,5) in einem 50 ml Schraubröhrchen gründlich gemischt und danach zur besseren Phasentrennung mit 5 ml Chloroform versetzt. Anschließend wurde erneut gründlich gemischt und das Gemisch zur Phasentrennung ruhen gelassen. Da die pH-Messung nicht direkt in der Phenolphase erfolgen kann, wurde zur behelfswisen pH-Wert-Messung im Überstand die obere (wässrige) Phase in ein neues Schraubröhrchen überführt und mit 5 ml Chloroform versetzt, gründlich gemischt und zur Phasentrennung ruhen gelassen, um diese wässrige Phase für die folgende pH-Messung weitestgehend vom Phenol zu separieren. In dieser oberen Phase wurde dann der pH-Wert bestimmt. Betrug der pH mehr als 4,5, wurde mit der ursprünglichen Phenol-Chloroform-Mischung das Equilibrieren wiederholt, d. h. die Phenol-Chloroform-Mischung wurde erneut mit 20 ml Natriumacetat (0,05 M; pH 4,5) versetzt. Dies wurde wiederholt, bis der pH-Wert des Phenol-Chloroforms auf 4,5 gesunken war. Das resultierende saure Phenol-Chloroform (4:1) wurde abschließend mit Natriumacetat (0,05 M; pH 4,5) lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

3.2.2.4 Qubit™-Messung

Die Konzentrationen der extrahierten Nukleinsäuren wurde mit dem Qubit-Fluorometer bestimmt. Die Messung beruht auf der Fluoreszenz von Farbstoffen, die spezifisch die zu untersuchende Nukleinsäure binden und nach dieser Bindung fluoreszierende Eigenschaften haben. Das Qubit™ Messgerät vergleicht die gemessenen Fluoreszenzsignale mit denen eingelesener Standards und berechnet basierend darauf die Konzentration der zu untersuchenden Nukleinsäure.

Zur Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA wurden 198 µl des Qubit™ RNA Broad Range (BR) Puffer in ein Qubit Assay Tube pipettiert, gefolgt von 1 µl der RNA-Probe und 1 µl des Qubit RNA BR Farbstoffes. Der Ansatz wurde kurz gevortext und 2 min inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration im Qubit-Fluorometer bestimmt. DNA-Konzentrationen wurden nach dem gleichen Schema gemessen, dafür wurde ein DNA-Puffer sowie der entsprechende Farbstoff verwendet und im Qubit-Fluorometer die Einstellung für DNA-Proben verwendet.

3.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Integrität von RNA und im Verlauf auch von DNA zu bestimmen, wurde eine Gelelektrophorese mit 1%igem Agarosegel durchgeführt.

Um RNasen zu denaturieren, wurde die Gelkammer zunächst mit 1%igem SDS gewaschen und mit ddH₂O ausgespült. Das Agarosegel wurde aus 0,4 g NEEB Agarose-Pulver, 40 ml 1X TAE (ddH₂O) und 400 µl Natriumhypochlorid hergestellt, die Lösung wurde ca. 2 - 3 min in der Mikrowelle bei 700 Watt erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Das Natriumhypochlorid soll zusätzlich zu genannten Hygienemaßnahmen möglicherweise enthaltene RNasen im Gel denaturieren. In die Gelkammer wurde ein Gelschlitten so eingebracht, dass durch die Gummidichtungen die Seiten dicht verschlossen waren. Passende Gelkämme wurden platziert und 40 ml der abgekühlten Agaroselösung in den Gelschlitten gegossen. Bei 4 °C polymerisierte das Gel für 20 - 30 min. Anschließend wurde der Schlitten mit dem polymerisierten Gel vorsichtig aus der Kammer entfernt und um 90 Grad gedreht. Die Kammer wurde mit 1X TAE randvoll befüllt und die Gelkämme wurden vorsichtig entfernt.

Für die Proben wurde je nach gemessener RNA-Konzentration das Volumen für 700 ng RNA mit der gleichen Menge 2X RNA Dye in einem Reaktionsgefäß gut vermischt, kurz zentrifugiert und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung der Banden wurden 3,3 µl DNA Hyperladder 1 kb mit 3,3 µl 2X RNA Dye ebenfalls in eine Tasche gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C und 100 V für 60 min durchgeführt. Um die RNA anschließend zu visualisieren, wurde das Gel für

30 min in einem Ethidiumbromid-Bad, bestehend aus 400 ml 1X TBE und 80 µl Ethidiumbromid, gefärbt. Ethidiumbromid ist ein interkalierendes Reagenz, das unter UV-Licht Nukleinsäuren sichtbar macht. Aufgrund seiner hohen Toxizität wurden die Färbungen unter dem Abzug und unter Verwendung von Handschuhen durchgeführt und streng darauf geachtet, das kontaminierte Material nicht außerhalb der speziellen Arbeitsflächen zu verteilen. Nach der Färbung wurde die RNA mit dem GelDoc-Apparat visualisiert. Danach wurde die Integrität der RNA anhand von drei Banden, 28S-, 18S- und 5S-rRNA evaluiert, wobei die 28S-Bande ungefähr die 2- bis 2,5-fache Intensität der 18S-Bande besitzen sollte.

3.2.2.6 Reverse Transkription mit Maxima RT und Gen-spezifischen Primern

Vor der reversen Transkription, kurz „RT“, wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese sichergestellt, dass die verwendete RNA intakt war und ihre Konzentration mittels Qubit-Messung bestimmt. Um die mögliche Kontamination der aufgereinigten RNA-Proben mit nicht vollständig entfernter, residuärer DNA zu überwachen, wurden in jedes Experiment eine "noRT"-Kontrolle (engl. für "keine RT") eingeschlossen. In der noRT-Kontrolle wurde die Reverse Transkriptase durch 0,5 µl ddH₂O ersetzt, sodass dort keine cDNA produziert werden und somit eine Amplifikation von aus RNA produzierter cDNA in der nachfolgenden PCR aufgrund fehlender Templates nicht stattfinden sollte. Eine trotzdem erfolgende Amplifikation von Substrat in der PCR aus der noRT-Kontrolle deutet folglich auf die Verunreinigung der RNA-Probe durch nicht vollständig entfernte, residuale genomische DNA hin.

Jede Reaktion mit Maxima-RT beinhaltete 10 µl Reaktionsansatz:

Reagenz	Volumen in µl
RNA (800 ng)	Je nach Konzentration
Primer (Gen-spezifisch)	1
dNTPs 10 mM	0,5
ddH ₂ O	Auffüllen bis 7,25 µl

Anschließend wurde die Mischung vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert.

Zusätzlich wurden 2 µl RT-Puffer, 0,5 µl Maxima Reverse Transkriptase (bzw. 0,5 µl ddH₂O in der noRT-Kontrolle) und 0,25 µl RNase Inhibitor pro RT-Reaktion verwendet. Diese Komponenten wurden jeweils nach Anzahl der Proben in den benötigten Mengen zunächst zu einem RT- oder noRT-Mastermix gemischt. Zu jedem Reaktionsgefäß mit den in der obigen Tabelle aufgeführten Komponenten wurden dann jeweils 2,75 µl des RT- bzw. noRT-Mastermix hinzugegeben, gut mit den Proben vermischt, die Ansätze

kurz zentrifugiert und die reverse Transkription dann unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Zeit (min)
50 °C	30:00
85 °C	05:00
4 °C	Pause

Die resultierenden cDNA-Proben bzw. die noRT-Kontrolle wurden anschließend entweder in einer RT-PCR oder RT-qPCR verwendet oder bei 4 °C für maximal 3 Tage oder bei -20 °C bis zu sechs Monate gelagert.

3.2.2.7 Reverse Transkription mit QuantaBio cDNA Flex Kit und Gen-spezifischen Primern

Neben der Maxima Reversen Transkriptase (Thermo Fisher) wurde auch das qScript Flex cDNA Kit (QuantaBio) mit Gen-spezifischen Primern (GSP) getestet, um Unterschiede in der Effektivität der Enzyme festzustellen. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz für 20 µl Reaktion verwendet:

Reagenz	Volumen in µl
RNA (800 ng)	Je nach Konzentration
Primer (Gen-spezifisch)	1
GSP-Enhancer	2
ddH ₂ O	Auffüllen bis 15 µl

Der Ansatz wurde 5 min bei 65 °C inkubiert und dann auf Eis gelagert. Währenddessen wurden Puffer und Enzym bzw. ddH₂O als Mastermix angesetzt:

Mastermix	Volumen in µl
qScript Flex Reaction Mix	4
qScript Reverse Transkriptase (bei RT)	1
ddH ₂ O (bei noRT anstelle des Enzyms)	1

Der Mastermix wurde den obigen Reaktionsmischen hinzugefügt und die reverse Transkription unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Zeit (min)
25 °C	10:00
42 °C	45:00
85 °C	05:00
4 °C	Pause

Da sich die Ergebnisse mit Gen-spezifischen Primern in der nachfolgenden RT-qPCR zwischen Maxima RT und QuantaBio qScript RT nicht unterschieden, wurde aus ökonomischen Gründen in den Folgeexperimenten mit GPR55 mRNA die kostengünstigere Maxima Reverse Transkriptase von Thermo Fisher verwendet.

3.2.2.8 Reverse Transkription mit Random Primern

Da die GPR55 mRNA sehr gering exprimiert ist und es nach RT mit Gen-spezifischen Primern bei einigen Primer Sets zur Amplifikation von unspezifischen Produkten anstatt des erwarteten korrekten Produktes in der RT-(q)PCR kam, wurde die RT alternativ mit Random Primern durchgeführt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass eine unspezifische Amplifikation selektierter Bereiche des Transkriptoms nicht bereits in der reversen Transkription, also bei der Herstellung der cDNA, auftritt. Außerdem kommt es bei Benutzung von Random Primern zur Produktion einer insgesamt größeren Menge an cDNA, weil die Random Primer an sehr vielen verschiedenen Stellen in der mRNA-Population binden und eine reverse Transkription initiieren können. Aus nicht vollständig verstandenen Gründen führte dieses Random Priming in vielen Fällen zu weniger unspezifischen Banden bei guter Amplifikation der Bande mit der korrekten Länge in der qPCR (s. 5.3.1).

Es wurden wieder beide Enzyme, Maxima RT von Thermo Fisher sowie qScript RT von QuantaBio, getestet. Die folgenden Protokolle wurden verwendet:

Maxima RT (Thermo Fisher):

Reagenz	Volumen in µl
RNA (800 ng)	Je nach Konzentration
Random Hexamer (#SO142)	1
dNTPs 10mM	1
ddH ₂ O	Auffüllen bis 14,5 µl

Der Ansatz wurde 5 min bei 65 °C inkubiert und dann auf Eis gehalten. Zu jeder Reaktion wurde der Enzymmix gegeben:

Mastermix	Volumen in μl
5X RT Puffer	4
Maxima RT (bei RT)	1
ddH₂O (bei noRT)	1
RNase Inhibitor	0,5

Die reverse Transkription wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt:

Temperatur	Zeit (min)
25 °C	10:00
50 °C	30:00
85 °C	05:00
4 °C	Pause

qScript Flex cDNA Kit (QuantaBio):

Reagenz	Volumen in μl
RNA (800 ng)	Je nach Konzentration
Random Primer	2
ddH₂O	Auffüllen bis 15 μl

Der Ansatz wurde 5 min bei 65 °C inkubiert und dann auf Eis gehalten. Zu jeder Reaktion wurde der Enzymmix gegeben:

Mastermix	Volumen in μl
qScript Flex Reaction Mix	4
qScript Reverse Transkriptase (bei RT)	1
ddH₂O (bei noRT anstelle des Enzyms)	1

Die reverse Transkription wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt:

Temperatur	Zeit (min)
25 °C	10:00
42 °C	45:00
85 °C	05:00
4 °C	Pause

3.2.2.9 Genomische DNA-Extraktion

Um die Primer für die späteren RT-PCR und RT-qPCR Reaktionen zu validieren, wurden sie zunächst an genomischer DNA getestet. Dies hat den Vorteil, dass durch eine anschließende Analyse per Gelelektrophorese unspezifische Bindung der Primer an falschen Lokalisationen im Sequenzraum des gesamten Genoms und damit auch im Transkriptom ausgeschlossen werden konnte, sofern die Primer-Paare keine Exon-Exon-Grenzen oder ganze Introns überspannten.

Die Extraktion von genomischer DNA aus Huh-7 Zellen wurde mit dem Invitrogen PureLink Genomic DNA Kit von Thermo Fisher durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein Heizblock auf 55 °C vorgeheizt. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und die adhären Zellen wurden durch Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Zelllösung wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 250 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, ohne das Zellpellet zu beschädigen. Das Pellet wurde daraufhin in 200 µl PBS resuspendiert. 20 µl Proteinase K und 20 µl RNase A wurden zur Probe hinzugefügt, kurz gevortext und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer hinzugefügt und durch Vortexen eine homogene Lösung hergestellt. Das Gemisch wurde für 10 min bei 55 °C inkubiert, um den Protein-Verdau zu fördern. Anschließend wurden 200 µl 96 - 100%iger Ethanol zum Lysat gegeben und 5 Sekunden gevortext, bis eine homogene Mischung entstanden war.

Bevor mit den weiteren Schritten fortgefahren werden konnte, wurden zum Wasch-Puffer 1 und 2 zunächst 15 ml 96 - 100%iger Ethanol hinzugefügt. Eine Zentrifugationssäule wurde in ein Sammelgefäß gesteckt, das Lysat (ca. 640 µl) wurde auf die Säule gegeben und die Säule für eine Minute bei Raumtemperatur und 10.000 x g zentrifugiert. Der Inhalt des Sammelgefäßes wurde verworfen und ein neues Sammelgefäß unter die Säule gespannt. Um die DNA zu waschen, wurden 500 µl Wasch-Puffer 1 auf die Säule gegeben und wieder bei Raumtemperatur für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das alte Sammelgefäß wurde mitsamt Inhalt verworfen und durch ein neues Sammelgefäß ersetzt. Anschließend wurden 500 µl Wasch-Puffer 2 auf die Säule gegeben und für 3 min bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Wieder wurde das Sammelgefäß verworfen. Die Säule wurde auf ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und es wurden 30 µl Elutions-Puffer auf die Säule gegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Im Reaktionsgefäß befand sich nun die aufgereinigte genomische DNA.

Die Konzentration wurde mittels Qubit-Fluorometer gemessen und die gDNA auf 100 ng/μl verdünnt. Die Probe wurde langfristig bei -20 °C gelagert.

3.2.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (Endpoint-PCR)

Alle Schritte zum Anfertigen des PCR-Ansatzes wurden an einer sterilen Bank unter einem Abzug und auf Eis durchgeführt. Verwendete Materialien und Oberflächen wurden mit 80%igem Ethanol desinfiziert. Sauberes Arbeiten ist besonders wichtig, um eventuelle Kontaminationen mit DNA aus der Umgebung zu vermeiden, die in der PCR zu unspezifischer Amplifikation führen.

In vorangegangenen Experimenten von Nikolai Grahn (M.Sc.) wurden bereits einige Parameter für die PCR an genomischer DNA exploriert. Somit wurden diese Bedingungen (Taq (Na_4) $_2\text{SO}_4$ Puffer, 3 mM Mg^{2+}) für weiterführende Experimente übernommen und in der RT-PCR ggf. angepasst.

Für die PCR mit gDNA wurden in einem Mastermix zunächst die Taq-Polymerase und der passende Ammonium-Puffer mit Magnesium, dNTPs und ddH₂O vermischt. Die Magnesiumkonzentration betrug pro Reaktion 3 mM. Es wurden pro 25 μl Reaktion 0,5 μl dNTPs verwendet, was einer Endkonzentration von 0,2 mM entspricht. Der Mastermix wurde in PCR-Reaktionsgefäße verteilt und jeweils 0,3 μl Forward und Reverse Primer sowie 50 ng DNA hinzugefügt. Zusammengefasst ergaben sich für jede Reaktion folgende Komponenten:

Reagenz	Volumen in μl
Taq (Na_4) $_2\text{SO}_4$ Puffer 10X	2,5
dNTPs 10 mM	0,5
MgCl ₂ , 25 mM	3
Primer forward	0,3
Primer reverse	0,3
Taq Polymerase	0,625
gDNA	0,5 (bei c = 100 ng/μl)
ddH ₂ O	Auffüllen auf 25 μl

Die Proben wurden vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die PCR im ThermoCycler unter folgenden Parametern durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	95 °C	02:00 bei cDNA 03:00 bei gDNA
Primer-Anlagerung	Primerspezifisch bzw. Temperaturgradient	00:30
Elongation	72 °C	00:30 Templates < 500 bp 01:00 Templates bis 1000 bp 02:00 Templates bis 2000 bp
Finale Extension	72 °C	10:00
Pause	4 °C	∞

Die Elongationszeit war dabei abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Üblicherweise werden für die Taq-Polymerase 1 min für 1000 Basenpaare kalkuliert. Die initiale Denaturierung betrug bei gDNA 3 min und bei cDNA 2 min. Um die optimale Anlagerungstemperatur der Primer zu explorieren, wurden für jedes Primer-Paar Temperaturgradienten zwischen 58 und 64 °C erstellt. Angestrebt wurde die Temperatur, bei der die Amplifikation des gewünschten Amplikons maximal und die Produktion unerwünschter Nebenprodukte minimal waren. Die PCR-Produkte wurden mithilfe von Acrylamid-Gelelektrophorese visualisiert und über die Amplikonlänge validiert.

3.2.2.11 Acrylamid-Gelelektrophorese

Um die Größe der PCR-Produkte zu bestimmen und unspezifische Produkte sowie Primer-Dimer zu visualisieren, wurde ein 7,5%iges Acrylamidgel verwendet.

Nachdem die Glasplatten gründlich mit 70%igem Ethanol gereinigt worden waren, wurden sie in den Gießrahmen gespannt und dieser im Gießständer befestigt. Anschließend wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen pro Gel zunächst 1,9 ml Bisacrylamid-Acrylamid 40 mit 8,1 ml 1X TBE gegeben, invertiert und daraufhin 100 µl APS 10 % und 10 µl TEMED hinzugefügt. Erneut wurde 2- bis 3-mal invertiert. 10 ml des angemischten Gels wurden zwischen die Glasplatten gegossen, der Plastikkamm eingesetzt und das Gel für 20 min polymerisiert. 10 - 12,5 µl der PCR-Produkte wurden mit 2,5 µl 6X Purple Dye vermischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Glasplatten in die Gelkammer eingesetzt, der Kamm entnommen und die Taschen mit den Proben befüllt. Zur Größenbestimmung der Amplikons wurden die Längenstandards Hyperladder 1 kb und GeneRuler Low Range verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei 100 V für 60 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gele für 15 min in Ethidiumbromid gefärbt und mit dem GelDoc-System visualisiert.

3.2.2.12 RT-PCR als Prä-Amplifikation vor RT-qPCR

Aufgrund der geringen Expression der zu untersuchenden mRNAs musste vor der Evaluation der Primer-Effizienzen mittels Standardkurven zunächst eine Prä-Amplifikation in einer Endpoint-RT-PCR durchgeführt werden. Die dabei amplifizierten PCR-Produkte wurden anschließend als Substrate in cDNA-Verdünnungsreihen eingesetzt. Eine verlässliche Evaluation mittels Standardkurven von 10-fachen Verdünnungsreihe der cDNA war sonst bei Ct-Werten > 30 nicht möglich.

Um die Produkte möglichst effizient und fehlerfrei zu amplifizieren, wurde die Taq-Polymerase dabei durch die Phusion Polymerase ersetzt. Diese besitzt eine höhere Genauigkeit und Produktausbeute. Zudem zeigt sie 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, wodurch der neu synthetisierte DNA-Strang Korrektur gelesen wird, Nukleotid-Mismatches korrigiert werden können und somit die Fehlerrate sinkt. Dies war in der Prä-Amplifikation besonders wichtig, da die PCR-Produkte als Substrate in der qPCR eingesetzt werden sollten. Die verwendete cDNA entstammte einer RT mit Random Primern.

Reagenz	Volumen
5X Phusion Puffer	10 µl
dNTP 10 mM	1 µl
Primer forward 10 µM	2,5 µl
Primer reverse 10 µM	2,5 µl
Phusion Polymerase High Fidelity	0,5 µl
cDNA unverdünnt (aus 20 µl RT-Reaktion)	2 µl
ddH₂O	31,5 µl

Für jedes Primer Set wurde eine eigene Prä-Amplifikation durchgeführt, da sich die Amplikonsequenzen der verwendeten Primersets teilweise überlappten und es somit bei Multiplex-Ansätzen zu fehlerhaften Produkten in der RT-PCR hätte kommen können. Somit wurde bei mehreren Reaktionen zunächst ein Mastermix ohne Primer und cDNA erstellt, der im nächsten Schritt aufgeteilt und mit den entsprechenden Primer-Sets versetzt wurde und zuletzt wurde die cDNA hinzugefügt. Es wurde das vom Hersteller empfohlene Protokoll verfolgt. Da aus zuvor erfolgten RT-qPCR Analysen der Spleißvarianten die Ct-Werte bekannt waren, konnte für die Endpoint-RT-PCR eine Zyklusanzahl von 35 gewählt werden, bei der sich die Amplifikation der Produkte im exponentiellen Bereich befand.

Temperatur	Zeit (min)	
98 °C	00:30	
98 °C	00:10	35 Zyklen
60 °C (bzw. 62 °C bei Primer Set 10)	00:20	
72 °C	00:15	
72 °C	05:00	

Die PCR-Produkte wurden anschließend mithilfe eines Acrylamidgels auf die erwartete Amplikonlänge und unspezifische Produkte überprüft und für die Verwendung in der RT-qPCR aufgereinigt.

3.2.2.13 PCR-Aufreinigung

Um die PCR-Produkte der Prä-Amplifikation als Substrat für die RT-qPCR verwenden zu können, mussten die PCR-Proben aufgereinigt werden, damit Primer, dNTPs und Salze entfernt wurden, die die RT-qPCR beeinflussen könnten. Dafür wurde das GeneJet PCR Purification Kit von Thermo Fisher verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt. Anschließend wurde die DNA in 25 µl Elutions-Puffer eluiert. Die Kontamination durch verbliebene Primer ließ sich in der sich anschließenden qPCR mithilfe einer noPrimer-Kontrolle eruieren, in die beim Ansetzen der qPCR-Reaktion keine Primer hinzugefügt wurden. Da diese keine Amplifikation durch eventuell zurückgebliebene Primer aus der Endpoint-PCR zeigte, wurde somit die ausreichende Aufreinigung bestätigt.

3.2.2.14 Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR)

Nachdem die Primer in der PCR an gDNA validiert waren, wurden sie in der RT-qPCR geprüft, optimiert und zur Untersuchung der Spleißvariantenexpression verwendet. Die reverse Transkription der RNA wurde zuvor wie oben beschrieben durchgeführt.

Die quantitative Real-time PCR ist eine Methode zur Detektion und Quantifizierung von Nucleinsäuren. Dabei wird eine Standard-PCR von meist 40 Zyklen durchgeführt und mithilfe von interkalierenden Farbstoffen, beispielsweise SYBR Green, anhand der kontinuierlichen Messung der Fluoreszenzemission die Menge der amplifizierten dsDNA quantifiziert (Harshitha und Arunraj, 2021). Die Kurve ist dabei charakteristisch sigmoidal. Zur relativen Quantifizierung von verschiedenen Proben verwendet man den Ct-Wert (engl. cycle threshold). Dies ist der Zyklus, bei dem das gemessene Fluoreszenzsignal die exponentielle Phase erreicht und somit die (artifizial gewählte) Schwelle des Hintergrundes übersteigt. Je früher dieser Wert erreicht wird, je kleiner also der Ct-Wert, desto höher ist die Menge der Ausgangsprobe und somit die

Expression des untersuchten Gens (Harshitha und Arunraj, 2021). Die Ct-Werte folgen aufgrund der Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus der PCR einer logarithmischen Skala mit der Basis 2.

Darüber hinaus ist es möglich anhand von Schmelzkurvenanalysen die Charakteristika der amplifizierten Produkte zu untersuchen. Schmelzkurven werden am Ende der qPCR-Reaktion erhoben. Dabei wird graduell die Temperatur erhöht und beim Zerfall der doppelsträngigen Produkte der Abfall der gemessenen Fluoreszenz detektiert. Je nach Länge der Produkte und Bindungskräften der Basen der DNA „schmelzen“ dabei die Produkte bei niedrigeren oder höheren Temperaturen. Primer-Dimere sind beispielsweise kürzer als die erstrebten Amplikons, das Fluoreszenzsignal fällt also bereits bei niedrigeren Temperaturen steiler ab. Hingegen kann bei steilen Kurven mit Schmelzspitzen bei höheren Temperaturen auf die Amplifikation eines einzelnen Produktes bzw. von Produkten mit gleicher Schmelzkinetik geschlossen werden (Harshitha und Arunraj, 2021).

Für eine RT-qPCR wurden die Reaktionsansätze immer an einer sterilen Bank unter stetiger Luftzirkulation auf Eis pipettiert. Pro 10 µl Reaktion beinhaltete der Ansatz folgende Reagenzien:

Reagenz	Volumen
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	5 µl
Primer forward 10 µM	0,3 µl
Primer reverse 10 µM	0,3 µl
cDNA Verdünnung	3 µl
ddH₂O	1,4 µl

Sollten mehrere verschiedene Primer Paare in einem Reaktionsdurchlauf getestet werden, wurde zunächst ein Mastermix aus SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix und Wasser erstellt, dieser dann aufgeteilt und verschiedene Mastermixe mit den jeweiligen Primern erstellt. Diese Mastermixe wurden anschließend in eine 96-Well PCR-Platte pipettiert, abschließend die cDNA hinzugefügt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Die Well-Platte wurde anschließend für 1 min zentrifugiert, um Luftblasen im Ansatz zu minimieren. Die RT-qPCR-Reaktion wurde im BioRad CFX Connect Real-Time PCR Detection System mit folgendem Protokoll durchgeführt:

Temperatur	Zeit (min)	
95 °C	00:30	
95 °C	00:03	40 Zyklen
62 °C	00:30	
65 °C - 85 °C	0,5 °C Inkrement, 00:05	

Die Produkte wurden anschließend auf Spezifität untersucht, indem die Schmelzkurven analysiert wurden und die Produktlängen auf einem Acrylamidgel mit den erwarteten Amplikonlängen verglichen wurden.

3.2.2.15 Primer Effizienz Bestimmung mittels Standardkurven

Zur Prüfung der Primer-Effizienz können Standardkurven durchgeführt werden. Da die Expression der untersuchten mRNAs gering war (Ct-Werte > 30), wurde zunächst in einer Endpoint-PCR eine Prä-Amplifikation der Zielprodukte durchgeführt, um genug Ausgangssubstrat für 10-fache Verdünnungsreihen zu generieren (3.2.2.12). Die cDNA-Verdünnungen wurden folgendermaßen hergestellt:

Zielkonzentration	Zusammensetzung
1	cDNA aus RT (= stock)
10 ⁻¹	2 µl stock + 18 µl ddH ₂ O
10 ⁻²	2 µl 10 ⁻¹ + 18 µl ddH ₂ O
10 ⁻³	2 µl 10 ⁻² + 18 µl ddH ₂ O
10 ⁻⁴	2 µl 10 ⁻³ + 18 µl ddH ₂ O
10 ⁻⁵	2 µl 10 ⁻⁴ + 18 µl ddH ₂ O

Diese cDNA-Verdünnungen wurden dann in jeweils mindestens zwei technischen Replikaten in der RT-qPCR verwendet.

Um die Effizienz der Reaktion zu erheben, wurden die Ct-Werte der einzelnen Verdünnungen in einer logarithmischen Skala aufgetragen. Es ergab sich eine lineare Regressionskurve durch die Datenpunkte. Anschließend wurde die Steigung (engl. slope) der Geraden berechnet. Der Wirkungsgrad bzw. die Effizienz (E) wurde anhand der Steigung mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{Steigung}}\right)} - 1$$

Für eine Primer-Effizienz von 100 %, entsprechend einer Verdopplung der PCR-Produkte in jedem Zyklus (E = 1), beträgt die Steigung -3,32. Durch die logarithmische Auftragung der Ct-Werte entspricht dies auch einem ΔCt der Amplifikationskurven von

ungefähr 3,32. Eine Reaktion sollte eine Effizienz von 90 - 110 % haben, dies entspricht einer Steigung der Geraden zwischen -3,58 und -3,10 (Bradburn, 2021).

R2-Wert: Der R2-Wert ist der Korrelationskoeffizient einer 10-fachen Verdünnungs-Standard-Kurve mit mindestens zwei technischen Replikaten pro Verdünnungsschritt. Er sollte > 0,99 betragen (Bradburn, 2021).

3.2.3 Arbeiten mit HCV Plasmid

3.2.3.1 Plasmidpräparation und Restriktionsverdau

Das Plasmid JC1 war in vorherigen Arbeitsschritten durch Transformation kompetenter E. coli amplifiziert worden. Nachdem die Bakterien vorher über Nacht (8 - 12 Stunden) bei 37 °C gewachsen waren, wurden sie durch Zentrifugation pelletiert und mithilfe des GeneJET Plasmid Maxiprep Kits lysiert und das Plasmid wurde isoliert (durchgeführt durch M. Khajouei, M.Sc., AG Niepmann). Um es für weitere Methoden aufzubereiten, musste das Plasmid anschließend geschnitten werden, um die zirkuläre DNA in eine lineare DNA zu konvertieren.

Jede Reaktion beinhaltete 100 µl Ansatz mit 10 µg DNA-Plasmid. Pro 1 µg DNA-Plasmid wurde 1 µl Enzym Mlul-HF benötigt. Die benötigte Menge Plasmid wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Volumen DNA-Plasmid} = \frac{\text{Benötigte Menge Plasmid}}{\text{Konzentration Plasmid}}$$

Der Ansatz beinhaltete also:

Reagenz	Volumen
rCutSmart Puffer	10 µl
DNA Plasmid	Je nach Konzentration (Zielmenge 10 µg)
Enzym (Mlul-HF)	10 µl
ddH ₂ O	Auffüllen auf 100 µl

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37 °C über Nacht im Heizblock inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 µl Proteinase K hinzugefügt und eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Um die erfolgreiche Restriktion zu überprüfen, wurden anschließend 3 µl des Reaktionsgemisches entnommen und neben 250 ng ungeschnittenem DNA-Plasmid auf ein 1%iges Agarosegel geladen (1X TBE, 50 ml pro Gel, 3 µl Reaktionsgemisch + 6 µl BX Dye 1:10) und für 45 min bei 120 V laufen gelassen. Die Reaktion wurde mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion beendet und die DNA über Nacht bei -20 °C mit Natrium-Acetat und Isopropanol gefällt. Am nächsten Tag schloss sich eine Aufreinigung des

Pellets mit 75%igem Ethanol an (3 x) und die DNA wurde in 25 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Nachdem die Konzentration bestimmt worden war, konnte das geschnittene Plasmid in einer In-vitro-Transkription verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.2.3.2 *In-vitro-Transkription*

Das zuvor präparierte und geschnittene HCV Plasmid JC1 wurde mithilfe der T7-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert. Diese DNA-abhängige RNA-Polymerase stammt ursprünglich aus dem E. coli befallenen Phagen T7 und benötigt zur Initiation die Promotorsequenz TAATACGACTCACTATA, die sich direkt vor der zu transkribierenden Sequenz auf dem Plasmid befindet. Damit ein möglichst exaktes 3'-Ende der RNA erzeugt werden kann, befindet sich hinter der zu transkribierenden Sequenz ein Hepatitis-delta-Virus (HDV) Ribozym, das exakt vor seiner eigenen Sequenz in der transkribierten RNA spaltet, sowie wiederum dahinter der T7-Terminator. Die Schnittstelle für das Restriktionsenzym, das während der zuvor stattgefundenen Restriktion zur Linearisierung verwendet wurde, liegt hinter dem T7-Terminator.

Der Reaktionsansatz der In-vitro-Transkription enthielt neben dem linearisierten und aufgereinigten DNA-Template (s. 3.2.3.1) den Transkriptionspuffer, Magnesiumchlorid, Ribonukleosidtriphosphate, DTT (ein reduzierendes Reagenz, das die Aktivität des Enzyms optimiert), RNase-freies Wasser und RNase-Inhibitor zum Schutz der entstehenden RNA vor enzymatischem Abbau. Ein 50 µl Transkriptionsansatz hatte die folgende Zusammensetzung:

	Volumen	Stammlösung	Endkonzentration
Gesamtvolumen	50 µl		
ddH₂O	X µl		
Transkriptionspuffer	5 µl	10X	1X
rNTPs	7,5 µl (jeweils 1,9 µl)	25 mM	3750 µM
DTT	0,5 µl	1000 mM	10 mM
DNA Template	X µl	X µg/µl	30 µg/ml
T7-RNA-Polymerase	1 µl	50 U/µl	1 U/µl
RNase Inhibitor	0,5 µl	40 U/µl	0,16 U/µl
MgCl₂	5 µl	50 mM	5 mM

Je nach Konzentration des aufgereinigten linearisierten DNA-Plasmids wurde die eingesetzte Menge pro Reaktionsansatz berechnet, sodass eine Endkonzentration von 30 µg/ml vorlag. Abschließend wurde mit Wasser auf 50 µl Volumen aufgefüllt.

Nach gründlichem Mischen wurden 49 µl des Ansatzes in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µl T7-Polymerase versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 Stunden. Anschließend wurde die Reaktion 20 min bei -20 °C abgekühlt, um kürzere "run-off"-RNAs durch die gleichzeitige Aktivität der RNA-Polymerase und der nachfolgend eingesetzten DNase zu erhalten, und dann mit Turbo DNase für 30 min bei 37 °C verdaut.

3.2.3.3 DNase-Verdau

Um die in der Probe enthaltene DNA zu entfernen und sie als Störfaktor in nachfolgenden Reaktionen zu eliminieren, wurde der Transkriptionsansatz mit Turbo DNase behandelt. Diese spaltet doppelsträngige DNA unspezifisch zu 5'-phosphorylierten Oligodesoxynukleotiden, zeigt dabei eine erhöhte Aktivität und Effizienz als herkömmliche DNase 1 und bleibt bei Vorhandensein von Salzen aktiv.

Es wurden 2 µl Turbo DNase zum abgekühlten Reaktionsansatz gegeben und die Probe für 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin folgte eine Aufreinigung mit dem NEB Monarch RNA Clean Up Kit nach den Herstellerinstruktionen. Die RNA wurde in 25 µl ddH₂O eluiert, die Konzentration gemessen und der Erfolg der Transkription mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese geprüft (0,8 % Agarosegel, 1X TAE-Puffer). 1 µl der RNA wurde mit 10 µl BX Dye (1:10) versetzt, 10 min bei 65 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu lösen, und dann für 50 min bei 120 V und 4 °C im Gel laufen gelassen.

3.2.3.4 miRNA-122 Hybridisierung

Bevor die miRNA-122 in die Huh-7 Zellen transfiziert wurde, mussten die miRNA-Einzelstränge zunächst hybridisiert werden. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

miR-122 mat: 5'-(phos) UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3';

miR-122*: 5'-(phos) AACGCCAUUAUCACACUAAAUA-3'

Der (partielle) Doppelstrang wurde hergestellt, indem gleiche Mengen des miRNA-122 "Guide"-Strangs ("mat" für "mature") und des komplementären "Passenger"-Strangs (mit * gekennzeichnet) in einen Thermocycler gegeben wurden und die Temperatur kontinuierlich von 90 °C auf 4 °C (1 °C pro Minute) gesenkt wurde. Dieser partielle Doppelstrang ist in der Zelle das Substrat für die Entwindung durch Argonaute-2-Protein und der "Guide"-Strang wird dann vom Argonaute-Protein als Sonde für Detektion der Ziel-(m)RNA verwendet.

3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer Proteine, die aus Zellen oder Geweben extrahiert wurden. Diese werden aufgrund ihrer Größe in einem

Acrylamidgel durch Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen („geblottet“). Durch Hinzugeben eines spezifischen Primärantikörpers, der das Protein auf der Membran bindet, und nachfolgend eines Sekundärantikörpers, der den Primärantikörper bindet und anschließend durch eine enzymatische Reaktion sichtbar gemacht werden kann, wird das gesuchte Protein nachgewiesen (Holschbach, 2024). In einem reduzierenden Western Blot werden die Proteine denaturiert und reduziert (meist mit SDS), um die Disulfidbrücken aufzubrechen, die Proteine zu linearisieren und somit im Gel eine Trennung nach Molekulargewicht zu ermöglichen. In einem nativen Western Blot hingegen verbleiben die Proteine in ihrem nativen Zustand (Holschbach, 2024).

Nach der Transfektion wurde mittels Western Blot überprüft, ob die virale RNA in den Zellen erfolgreich translatiert wurde. Dafür wurde die viruseigene Protease NS3, die neben anderen Nicht-Strukturproteinen für den viralen Lebenszyklus benötigt wird, in einem Western Blot nachgewiesen.

3.2.4.1 Lyse der Zellen

Es wurde zunächst 1 ml Protein Inhibitor zu 6 ml RIPA Lyse-Puffer gegeben und das Gemisch auf Eis gekühlt. Die transfizierten Zellen in der 6-Well-Platte wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend wurde pro Well 350 µl Lyse-Puffer hinzugefügt. Die Zellen wurden für 15 min unter stetigem Schwenken auf Eis inkubiert und das Zelllysate anschließend gründlich auf- und abpipettiert, bevor es in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Wieder wurde das Lysat für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C bei 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für den weiteren Prozess auf Eis gehalten oder bei Durchführung des Western Blot zu einem späteren Zeitpunkt bei -40 °C gelagert.

3.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteine nach Größe zu separieren, wurden sie in einem Acrylamidgel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (SDS-PAGE). Um eine Spannweite der Proteingrößen von 10 bis 250 kDa abbilden zu können, wurde ein Gel mit einem Konzentrationsgradienten angefertigt, der von sich von 6 % bis 20 % erstreckte. Für das Befüllen der Taschen des Gels wird dem Gradientengel ein separates Sammelgel aufgelagert, damit die Proteine in ihrem Puffer während der Elektrophorese alle zur gleichen Zeit in das separierende Gel eintreten. Es wurden jeweils ein Gel für die Positivkontrolle GAPDH und ein Gel für das gesuchte Protein NS3 angefertigt. Dabei wurden die folgenden Reagenzien verwendet (Mengen für 2 Gele):

20 % Trenngel:

Reagenz	Volumen
ddH ₂ O	0,5 µl
30 % Acrylamid	5,33 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2 ml
10 % SDS	80 µl
10 % APS	80 µl
TEMED	8 µl

6 % Trenngel:

Reagenz	Volumen
ddH ₂ O	4,2 µl
30 % Acrylamid	1,6 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2 ml
10 % SDS	80 µl
10 % APS	80 µl
TEMED	8 µl

Die Reagenzien wurden jeweils in einem 50 ml Reaktionsgefäß vermischt. Um den Gradienten herzustellen, wurden zunächst mit einer 10 ml Pipettenspitze mit dem Pipetboy 4 ml des 6 % Gels aspiriert und anschließend in dieselbe Pipette 4 ml des 20%igen Gels gezogen, sodass sich das höher konzentrierte Gel in der Pipette unter dem niedriger konzentrierten befand. Durch Aspirieren einer Luftblase, die durch die Pipettenspitze nach oben aufsteigt, wurde eine teilweise Durchmischung der beiden Konzentrationen erreicht und das Gradientengel anschließend zwischen die beiden vorbereiteten Gießplatten (s. 3.2.2.11) bis ca. 1,5 cm unter den oberen Rand gefüllt, wobei sich ein recht guter Gradient ausbildet. Um eine Austrocknung während des Polymerisierens zu verhindern, wurde dem Gel eine Schicht Isopropanol aufgelagert.

Das 6%ige Sammelgel wurde folgendermaßen hergestellt (Menge für 2 Gele):

Reagenz	Volumen
ddH ₂ O	2,6 ml
30 % Acrylamid	1 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde der Isopropanol abgegossen, das Sammelgel eingefüllt und ein Gelkamm (10 wells, 1,5 mm) eingebracht. Das Zellysate wurde mit 4x Laemmli Puffer versetzt (30 µl Lysat + 10 µl Laemmli Puffer) und für 5 min bei 95 °C gekocht, um sicherzustellen, dass alle Proteine denaturiert wurden. Anschließend wurden die Proben auf Eis gehalten, bis sie in das Gel gegeben wurden. Für die Proben zur Detektion von NS3 wurden jeweils 25 - 30 µl pro Tasche geladen, für

die Positivkontrolle GAPDH wurden jeweils 10 µl geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V bei Raumtemperatur für 1,5 bis 2 h, bis der blaue Farbstoff (Bromphenolblau) das Gel verlassen hatte.

3.2.4.3 Western Blot

Nachdem die Proteine in der Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, sollten sie durch die Übertragung auf eine Nitrozellulose-Membran immobilisiert werden. Dabei wird elektrischer Strom eingesetzt, durch den die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert werden („Blot“).

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus den Gießplatten mobilisiert und das Sammelgel vorsichtig abgeschnitten. Es wurde ein „Sandwich“ bestehend aus Schwamm - 2 x Filterpapier - Gel - Nitrozellulosemembran - 2 x Filterpapier - Schwamm in der Transferkassette angelegt, dabei wurden die einzelnen Komponenten (außer das Gel) stets vorher in Transferpuffer angefeuchtet. Wichtig war sicherzugehen, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten eingeschlossen wurden. Dafür wurde am Ende mit einer Blot-Rolle vorsichtig über das letzte Filterpapier gerollt. Die Transferkassette wurde in den Kassettenhalter eingespannt und dieser in den Transfertank gestellt, welcher mit eiskaltem Transferpuffer aufgefüllt wurde. Zusätzlich wurde ein Kühlpaket im Tank deponiert. Der Transfer erfolgte bei 4 °C bei 280 mA für 90 min. Dabei wandern die mit SDS negativ geladenen Proteine aus dem Gel Richtung Plus-Pol auf die Membran.

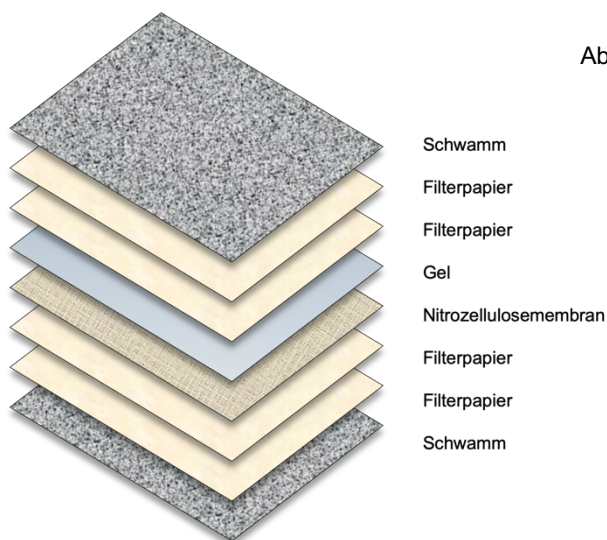


Abbildung 9: Aufbau eines „wet tank“ Transfers.

3.2.4.4 Immunochemie zur Detektion der Proteine

Nach dem Blot wurde die Membran vorsichtig entnommen und über Nacht bei 4 °C bei stetigem Schwenken in Blocking Lösung inkubiert. Diese sorgte durch den Gehalt an

Milchpulver für eine homogene Beschichtung der Membran mit Proteinen, wodurch die unspezifische Bindung der Nachweisantikörper im nächsten Schritt blockiert und somit das Hintergrundsignal reduziert werden sollte.

Die Antikörper wurden jeweils in einer Lösung aus 9 ml PBST 0,1 % und 1 ml Blocking-Lösung gelöst (NS3 1:1.000, GAPDH 1:5.000, HRP 1:10.000). Die Lösungen der Primärantikörper konnten insgesamt 3-mal verwendet werden und wurden nach Verwendung bei 20 °C gelagert. Der Sekundärantikörper Meerrettich-Peroxidase (Horse-Radish-Peroxidase, HRP) wurde immer frisch angemischt.

Nach der Inkubation wurde die Membran für 1,5 h mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken inkubiert und anschließend 3-mal mit 0,1 % PBST für jeweils 10 min gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der den Primärantikörper bindet. Wieder wurde die Membran im Anschluss 3-mal mit 0,1 % PBST gewaschen.

Um die Membran zu entwickeln und die Proteine sichtbar zu machen, wurde sie für 5 min in 500 µl Luminol-Lösung und 500 µl Peroxid-Lösung inkubiert und anschließend mit dem BioRad ChemiDoc visualisiert. Dabei macht man sich die enzymatische Aktivität der Meerrettich-Peroxidase zunutze, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist und durch die Zugabe der Entwicklerlösung durch Chemilumineszenz detektiert werden kann.

3.2.5 Statistik

3.2.5.1 *Delta-delta Ct-Methode*

Für die Berechnung der relativen GPR55 mRNA Expression aus den Daten der RT-qPCRs wurde die delta-delta-Ct Methode verwendet, die 2001 von Schmittgen und Livak entwickelt wurde (Livak und Schmittgen, 2001):

$$\text{Relatives Genexpressionslevel} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Für eine genaue Beschreibung der Herleitung wird auf die Originalpublikation verwiesen (Livak und Schmittgen, 2001). In dieser Arbeit wurde GAPDH als Housekeeping Gene in der RT-qPCR verwendet.

3.2.5.2 *Mann-Whitney Test*

Zur statistischen Auswertung der Genexpressionsanalysen wurde der Mann-Whitney-Test für nicht-normalverteilte Stichproben im Programm GraphPad PRISM verwendet, da dieser Test (im Gegensatz zum "students-t-test") auch für Stichproben, deren Elemente nicht normalverteilt sind, angewendet werden kann. Das Signifikanzniveau betrug 0,05.

3.2.6 Bioinformatische Methoden

3.2.6.1 Sequenzanalysen und Alignments

Die Sequenzanalysen und Alignments der Gene und mRNA Spleißvarianten wurden mit dem Programm SnapGene durchgeführt.

Für Inc-ITM2C-1, GPR55 und ITM2C-1 wurden die einzelnen Sequenzen den jeweiligen Datenbanken als FASTA Sequenzen entnommen und als neue Datei in SnapGene eingelesen. Weitere Untersuchungen beinhalteten so genannte Alignments (engl. für „Ausrichtung“ von Sequenzen, aneinander oder an einer Referenz-Sequenz), wobei zwei oder mehr Sequenzen miteinander verglichen wurden und dieser Vergleich optisch dargestellt wurde. Außerdem konnten mehrere Sequenzen mit einer einzelnen Referenzsequenz verglichen werden. Letztere Methode wurde u. a. für die Exon-Analysen verwendet. Das jeweilige Gen wurde als Referenzsequenz im Programm angegeben und daran die einzelnen cDNAs „aligned“. Die ausgesparten Bereiche in den cDNAs im Alignment stellten die Introns dar, da diese während der RNA-Prozessierung entfernt wurden und somit in mRNA und cDNA nicht mehr vorhanden waren. Somit konnten Übersichten über die Exon-Lokalisationen der einzelnen Spleißvarianten erstellt werden und die Varianten miteinander verglichen werden.

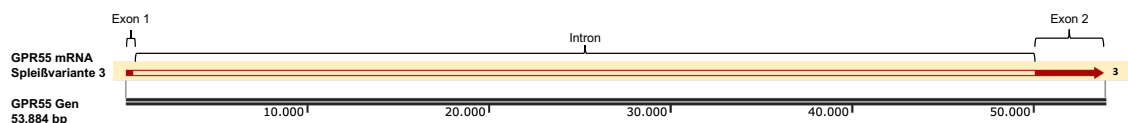


Abbildung 10: Beispiel einer Darstellung eines Alignments der mRNA Spleißvariante 3 an das GPR55 Gen. Die Exons sind als rote Balken dargestellt, da in der prozessierten mRNA die Introns bereits entfernt wurden, ist dieser Bereich als „leerer Balken“ dargestellt.

3.2.6.2 Primer-Design

Um möglichst spezifische Primer zu entwickeln, wurden einige Kriterien berücksichtigt. Die Primer sollten zwischen 18 und 24 Nukleotide beinhalten. Je nach GC-Gehalt wurden sie länger oder kürzer gestaltet, damit die Schmelztemperaturen der jeweils verwendeten Primer möglichst ähnlich waren. Eine sogenannte „GC-Clamp“, bestehend aus 1 - 2 Guanin- oder Cytosin-Nukleotiden am 3'- und 5'-Ende der Primer, sollte eine möglichst starke Bindung an den Primer-Enden fördern. Vor allem am 3'-Ende, wo die DNA-Polymerase an die Primer bindet, sollte die Bindung zum Template möglichst stark und spezifisch sein. Es wurde ein GC-Gehalt von 40 - 60 % sowie eine ausgeglichene Verteilung der A/T und G/C Paare angestrebt. Längere Wiederholungen von einzelnen Nukleotiden wurden vermieden, um Mispriming zu minimieren. Die Schmelztemperaturen der Primer sollten idealerweise 5 - 20 °C niedriger als die Elongationstemperatur

der verwendeten Polymerase sein. Zwei Primer, die als Paar zusammen in der PCR verwendet wurden, sollten maximal eine Differenz der Schmelztemperaturen von 2 °C vorweisen.

Mit dem IDT Tool OligoAnalyser (Integrated DNA Technologies, 2024) wurden die Primer auf Haarnadel-Formationen, Eigen-Komplementarität und Heterodimere überprüft. Dabei wurden in der Dimer-Analyse DeltaG Werte von 0 bis -9 kcal/mol angestrebt. Somit wurde die Gefahr minimiert, dass Primer-Paare komplementäre Regionen besaßen. Zur Vermeidung von Antisense-Aktivität wurden bestimmte Nukleotidabfolgen vermieden, wie beispielsweise GGGG, ACTG, TAA, CCGG und AAA.

Die Einzigartigkeit und Spezifität der Primer wurde mithilfe der Online-Ressource Nucleotide-BLAST (= Basic Local Alignment Search Tool) überprüft (NCBI, 2022a). Dabei wird die Primer Sequenz auf Vorhandensein im gesamten humanen Genom sowie Transkriptom überprüft, um im Vorfeld artifizielles Priming auf ungewünschten Genen oder Genombereichen zu entdecken und dann im Nachgang durch weitere Variation der Primer zu vermeiden. Aufgrund der Ergebnisse der BLAST-Untersuchungen wurden dann solche Primer-Kandidaten ausgeschlossen, die mehr als 80 % Übereinstimmung mit unerwünschten Sequenzen des humanen Genoms oder Transkriptoms besaßen. Besonders am 3'-Ende wurde auf Einzigartigkeit und Spezifität des Primers für die zu untersuchende gewünschte Sequenz geachtet, da dort die DNA-Polymerase ansetzt und amplifiziert. Weiterhin wurden mögliche unerwünschte Amplikons ausgeschlossen, indem das PCR-Produkt *in silico* untersucht wurde. Dafür wurden NCBI Primer-BLAST (NCBI, 2022b) sowie UCSC In-Silico PCR (University of California Santa-Cruz, 2024) verwendet.

Um die unerwünschte Amplifikation von genomischer DNA in der PCR zu vermeiden, wurde weiterhin versucht, die Primer, sofern möglich, auf Exon-Exon-Grenzen im gewünschten Gen zu platzieren („Exon-Exon-Junction-Primer“) oder Forward und Reverse Primer in zwei verschiedenen Exons anzuordnen („Intron-spanning Primer“), damit durch das Intron die zu amplifizierende Sequenz sich auf DNA-Ebene als zu lang für die DNA-Polymerase darstellte. Da die GPR55 mRNA Spleißvarianten jedoch nur 2 - 3 Exons beinhalteten, gestaltete sich das Design von spezifischen Primern auf Exon-Exon-Grenzen schwierig und konnte aufgrund von mangelnder Spezifität der Oligonukleotide nur selten eingehalten werden.

3.2.7 Textverfassung und Literaturverwaltung

Die vorliegende Arbeit wurde in Microsoft Word (Microsoft Corporation, Version 16.91) verfasst. Zur Literaturverwaltung und -verarbeitung sowie zum Zitieren wurde das Open-Source Programm Zotero (Digital Scholar, Version 6.0.37) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Gesamt-RNA-Extraktion

4.1.1 Qualitative Anforderungen an die RNA-Proben und Methoden zur Qualitätsbestimmung

Da angenommen wird, dass sowohl die GPR55 mRNA als auch Inc-ITM2C-1 nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden (s. 1.2.1.4), war es notwendig, die Gesamt-RNA der Zellen bei der Extraktion weitestgehend von genomischer DNA zu säubern. In den nachfolgenden Expressionsanalysen mittels RT-qPCR würde sonst residuale genomische DNA (gDNA) die Ergebnisse verfälschen. Um das Ausmaß der Kontamination mit gDNA in der RNA-Probe zu analysieren, wurde in jeder reversen Transkriptions-Analyse immer auch eine "noRT"-Kontrolle ("keine RT") durchgeführt, bei der keine Reverse Transkriptase hinzugefügt wurde und somit keine cDNA synthetisiert werden konnte. Im Falle von Kontamination der verwendeten RNA mit gDNA würde diese in der nachfolgenden qPCR in der noRT-Kontrolle amplifiziert werden. So würden eine Amplifikations- und eine Schmelzkurve sichtbar werden, die aber nicht aus der RNA stammen könnte, die analysiert werden soll, sondern aus der verunreinigenden gDNA.

Eine weitere Anforderung an das Protokoll stellte die Extraktion einer ausreichenden Menge an intakter RNA aus den Zellen dar. Während der Hauptteil der Gesamt-RNA in der Zelle aus tRNAs und rRNAs besteht, wird der Anteil an mRNAs auf ca. 3 - 5 %, abhängig von der Zellart und dem physiologischen Status der Zelle, geschätzt (Alberts et al., 2025). Deswegen ist es nötig, Degradation im Extraktionsprozess zu vermeiden, um den geringen Anteil an mRNA bestmöglich zu extrahieren.

Die Integrität der Gesamt-RNA sowie eventuelles Vorhandensein von gDNA wurden zunächst visuell anhand von Agarosegelen nach Elektrophorese beurteilt. Dabei wurde vor allem das Verhältnis der Intensitäten von 28S und 18S rRNA und die Integrität dieser Banden betrachtet. Diese beiden ribosomalen RNAs stellen sich als Banden in der Größe von 5 kb und 2 kb auf dem Agarosegel dar. Die theoretische Ratio der Intensitäten wird in der Literatur meist mit 2,7:1 angegeben, oft wird jedoch auch eine 2:1 Ratio als Maßstab für intakte RNA angesehen. Zu beachten ist, dass die mRNA selbst wegen ihrer geringeren Menge und ihrer sehr heterogenen Größenverteilung auf dem Gel nicht sichtbar ist bzw. durch den sehr viel größeren Anteil an rRNA überdeckt wird (Palmer und Prediger, n.d.). Es wurde also angenommen, dass bei Sichtbarkeit von scharfen 28S, 18S und 5S rRNA-Banden die Gesamt-RNA, inklusive der mRNA, intakt war. RNA-

Degradation wurde durch „verschmierte“ RNA im Hintergrund bzw. fehlende intakte Banden auf dem Agarosegel sichtbar.

Eine Methode zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration von RNA ist die spektroskopische Messung. Nukleinsäuren besitzen ein UV-Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Proteine hingegen besitzen ein UV-Absorptionsmaximum bei 280 nm, Phenol bei 270 nm. Zur Bestimmung der Reinheit wird oft das Verhältnis der Absorption bei 280 nm und 260 nm gebildet, die 260/280 Ratio, wobei eine Ratio von ca. 1,8 für DNA und eine Ratio von ca. 2 für RNA als „rein“ gelten. Zu niedrige 260/280 nm Ratios deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin. In der spektroskopischen Messung kann jedoch nicht zwischen Nukleotiden, RNA, ssDNA und dsDNA unterschieden werden, die alle bei 260 nm absorbieren (Thermo Fisher Scientific, 2011, 2008). Ebenso haben die unterschiedlichen Nukleotide innerhalb der Nukleinsäuren jeweils unterschiedliche Ratios. Die insgesamt gemessene 260/280 nm Ratio hängt somit auch von der Komposition der Nukleinsäure in der Lösung ab (Lehninger, 1975).

Weiterhin kann die 260/230 nm Ratio gebildet werden, da einige häufige Kontaminanten wie EDTA, Ethanol und Kohlenhydrate, die nach dem Prozess der Extraktion als Residuen in der Nukleinsäure-Lösung verbleiben können, ein UV-Absorptionsmaximum bei ca. 230 nm besitzen. Weitere häufig gebräuchliche Reagenzien in der Extraktion sind Guanidinium-HCl (DNA-Isolierung), das bei 230 nm absorbiert, und Guanidinium-Isocyanat (RNA-Isolierung), welches bei 260 nm absorbiert. Das weit verbreitete TRIzol ist eine phenolische Mischung mit Guanidinium-Isocyanat, weswegen es zwei Absorptionsmaxima bei 230 und bei 270 nm aufweist und folglich in den gebräuchlichen Ratios von 260/280 und 260/230 nicht klar zu identifizieren ist (Thermo Fisher Scientific, 2011, 2008). Kontaminationen in der RNA können zu falsch hoch gemessenen Konzentrationen bei den spektroskopischen Messungen führen, was wiederum die benötigten Konzentrationen in Folge-Reaktionen beeinflusst. Letztere können ebenfalls durch inhibierende Wirkungen von kontaminierenden Reagenzien direkt negativ beeinflusst werden. Die gebildeten Ratios der Absorptionsmaxima können nicht genau identifizieren, welche Verunreinigung vorliegt. Insbesondere können sie nicht die Verunreinigung von RNA mit DNA detektieren, da beide Nukleinsäuren die gleichen Absorptionsmaxima besitzen. Auch kann trotz Werten in den Referenzbereichen ein Problem in der Probe vorliegen, z. B. wird die Degradation von Nukleinsäuren schlecht erfasst. Zusammenfassend sind Reinheitsmessungen mittels UV-Absorptionsmessungen zwar bedingt nützlich, um die Probenqualität zu untersuchen, jedoch eignen sie sich bei der RNA-Extraktion nicht zur Erfassung von gDNA sowie RNA-Degradation (Thermo Fisher Scientific, 2008).

Am verlässlichsten kann die Intaktheit der RNA sowie die Kontamination mit gDNA mithilfe nachfolgender Methoden, in diesem Fall der RT-qPCR, ermittelt werden. Dafür wurden in jedem Durchlauf mindestens eine Positivkontrolle mit einem "Housekeeping gene", also einem "Haushalts"-Gen, das in den Zellen natürlicherweise hoch und weitgehend ubiquitär exprimiert wird, sowie eine noRT-Kontrolle eingeschlossen. In der noRT-Kontrolle wird der RNA keine Reverse Transkriptase in der reversen Transkription beigelegt, somit könnte nur genomische DNA in der nachfolgenden PCR amplifiziert werden. Durch die Positivkontrolle kann eine generelle Degradation der mRNA ausgeschlossen werden, wobei dabei zu beachten ist, dass "Housekeeping genes" wie GAPDH oder β -Actin sehr viel höher exprimiert sind als beispielsweise GPR55 mRNA. Durch die noRT-Kontrolle kann das Vorhandensein von gDNA kontrolliert werden.

Bei den RT-qPCRs ist die Analyse der Schmelzkurve des jeweiligen Amplikons wichtig. Diese Schmelzkurve sollte um die Schmelztemperatur des Amplikons herum möglichst schmal sein und ohne "Schultern", also ohne Abschnitte mehrfach die Richtung wechselnder Steigung in der Kurve (Harshitha und Arunraj, 2021). Nach den RT-qPCRs wurden die Produkte außerdem durch Acrylamid-Gelelektrophorese auf das Vorhandensein von gDNA in der noRT-Kontrolle sowie auf die korrekten Amplikonlängen geprüft, da die Schmelztemperatur eines Amplikon-Abschnittes allein streng genommen noch nicht unbedingt auf die Amplifikation des korrekten Sequenzabschnittes schließen lässt. Dies lässt sich besser durch die zusätzliche Analyse der korrekten Länge des Amplikons feststellen.

4.1.2 Entfernung der gDNA durch saure Phenol-Chloroform-Extraktion und DNase Behandlung mit RNase-Inhibitor

Bevor die Untersuchungen zur Expression von GPR55 mRNA durchgeführt werden konnten, wurde zunächst ein neues Protokoll zur RNA-Extraktion benötigt, was die zuvor beschriebenen Anforderungen an die RNA erfüllte. Das Protokoll, das zuvor verwendet worden war, führte seit Winter 2021/22 zur RNA-Degradation (s. Abbildung 11B). Als Grund dafür wurde die Behandlung mit Turbo DNase vermutet, wobei verschiedene frische Aliquots der DNase getestet worden waren und zum gleichen Ergebnis führten. Ob die DNase selbst mit RNasen verunreinigt war oder durch die Inkubation bei 37 °C RNasen, die aus dem Zelllysate übertragen worden waren, aktiviert wurden, war dabei nicht eruierbar. Um die Degradation durch RNasen zu hemmen, wurde die Extraktion nur noch unter Zugabe von RNase-Inhibitoren durchgeführt, die allerdings kostspielig sind. Somit standen im Mittelpunkt der Optimierung des Protokolls die Reduktion von RNasen während des Prozesses und die gründliche Entfernung von gDNA, die bis dahin

unter der Verwendung von Phenol mit einem pH-Wert von 7,5 - 8 nicht zufriedenstellend gelungen war.

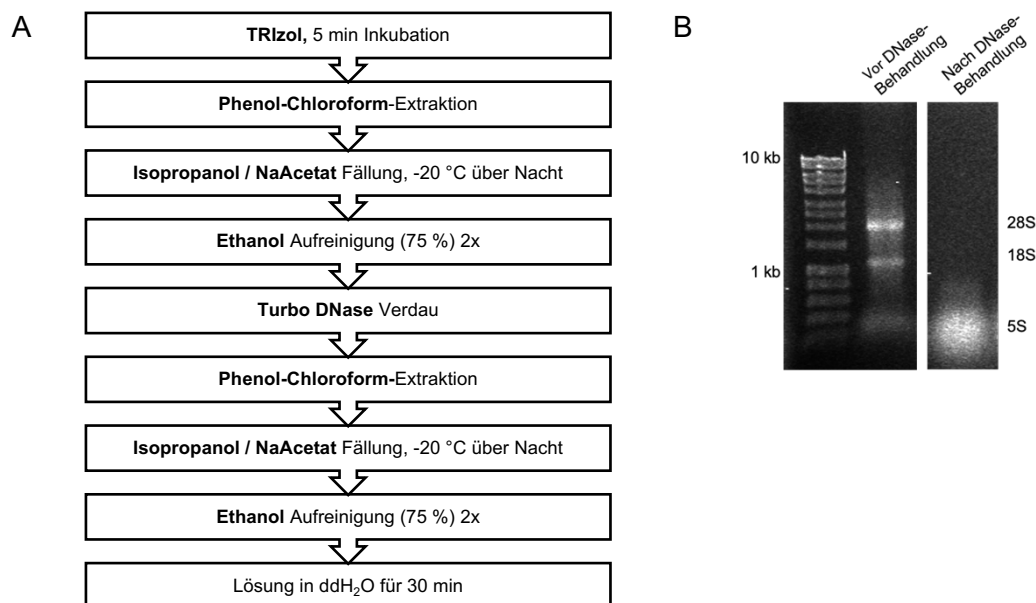


Abbildung 11: **(A)** Ursprüngliches Protokoll zur RNA-Extraktion **(B)** 0,8%iges Agarosegel mit Gesamt RNA vor DNase Verdau (links) und nach DNase Verdau (rechts) im Mai 2022.

Nach Anwendung der Turbo DNase ist eine Degradation der RNA sichtbar.

Zu Beginn der Extraktion wurde das Reagenz TRIzol verwendet. Dabei handelt es sich um eine monophasische Lösung aus Phenol, Guanidin-Isocyanat und weiteren proprietären Komponenten (Thermo Fisher Scientific, 2016). Das Prinzip beruht auf dem RNA-Isolationsprotokoll von Chomzynski und Sacchi, das sich bereits 1987 die chaotrope Wirkung des Guanidinium-Thiocyanats sowie den sauren pH-Wert bei der Extraktion von reiner RNA zunutze machte (Chomzynski, 1987). Guanidiniumsalze sind chaotrope Reagenzien und gehören somit zu den „strukturbrechenden“ Salzen. Das bedeutet, dass sie die Ordnung der Wasserstoffbrückenbindungen in wässrigen Lösungen stören, was sich ebenfalls auf im Wasser gelöste Makromoleküle auswirkt. Somit werden hydrophobe Effekte verringert und die räumliche Struktur von Makromolekülen, z. B. Proteinen, verändert (Chemie.de, 2024; Frenking et al., 2004). Da die treibende Kraft der Proteinfaltung, die Zusammenlagerung der hydrophoben Aminosäuren im Wasser, folglich gestört ist, werden Proteine durch Zugabe von chaotropen Salzen denaturiert. Dies führt u. a. zu einer Reduktion der enzymatischen Aktivität und in diesem Fall zur erwünschten Inaktivierung von RNasen in der Lösung (Chomzynski, 1987). Darüber hinaus stören chaotrope Reagenzien wie Guanidin-Isocyanat die Bildung und Aufrechterhaltung von Lipiddoppelschichten und erzeugen Zellstress. Auch das in TRIzol enthaltene Phenol bindet an die hydrophoben Aminosäuren in Proteinen und denaturiert und

inaktiviert sie dadurch. TRIzol wird somit sowohl zur Zellyse und -homogenisierung als auch zur Denaturierung der RNasen verwendet (Rio et al., 2010). Durch anschließende Zugabe von Chloroform und Zentrifugation erfolgt die Trennung in drei Phasen, die den Namen des kommerziell zu erwerbenden Reagenzes begründen. Die Lösung wird separiert in eine organische, hydrophobe Phase, die Phenol, Chloroform und den in dieser Phase löslichen Anteil der Proteine enthält, eine DNA-haltige Interphase und eine obere wässrige Phase, in der die RNA gelöst ist (Thermo Fisher Scientific, 2016). Durch vorsichtiges Abpipettieren soll die in der wässrigen Phase enthaltene RNA von den übrigen Komponenten getrennt werden, jedoch wird die Entfernung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten aus der Interphase oft nicht vollständig erreicht (Rio et al., 2010).

Um die gDNA-Kontamination zu reduzieren, wurde "saures Phenol" (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 125/25/1, pH 4,5, Thermo Fisher) verwendet. Der niedrige pH-Wert des Phenols sorgt während der Phenol-Chloroform-Extraktion für eine verstärkte Anreicherung der DNA in der hydrophoben Phase im Vergleich zum herkömmlichen Phenol (pH 7,5 - 8). Grund dafür ist die fehlende Hydroxyl-Gruppe der DNA am C₂-Atom des Riboserings, weswegen das Molekül weniger polar und somit hydrophober ist im Vergleich zur RNA, bei der die Hydroxylgruppe am C₂-Atom zur verstärkten Polarität führt. Bei niedrigem pH-Wert des Phenols sind die Phosphat-Gruppen der Nukleotide größtenteils mit Wasserstoff-Atomen gesättigt und somit neutral, weswegen die zusätzliche 2'-Hydroxylgruppe der RNA dann den entscheidenden Unterschied in der Polarität zwischen RNA und DNA begründet. Die RNA reichert sich folglich weitgehend in der wässrigen, polaren Phase an, während die DNA weitgehend in der hydrophoben Phase verbleibt (Xu et al., 2019). Bei vorsichtigem Abpipettieren des wässrigen Überstandes konnte somit die RNA aus der Probe isoliert werden. Die Entfernung von Phenolrückständen erfolgte regulär durch eine Fällung mit 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) über Nacht in Isopropanol und zweimaliges Waschen des Pellets mit 75%igem Ethanol sowie Lösen der RNA-Präparation in ddH₂O. Es schloss sich eine Behandlung mit Turbo DNase unter Zugabe von RNase-Inhibitor an. Weiterhin erfolgten eine erneute saure Phenol-Chloroform-Extraktion sowie die Fällung und Aufreinigung mit Ethanol.

Die Übersicht der RNA-Extraktion mit saurem Phenol und DNase-Behandlung unter RNase-Inhibitor Zugabe ist in Abbildung 12A dargestellt. Zwar konnte durch die Verwendung von saurem Phenol und DNase-Verdau mit RNase-Inhibitor die genomische DNA ausreichend entfernt und die RNA-Degradation zunächst reduziert werden, trotzdem war das Verhältnis der Intensitäten von 28S zu 18S rRNA im Agarosegel zunächst nicht zufriedenstellend. Die 18S rRNA-Bande war nur sehr schwach bzw. nicht sichtbar, und in diesen RNA-Proben konnte die GPR55 mRNA mit

keinem der Primerpaare in der RT-qPCR regelmäßig detektiert werden, was auf mangelnde Integrität der RNA bzw. der enthaltenen GPR55 mRNA hinweist. Grund für die RNA-Degradation könnte zusätzlich zu methodischen Problemen der trockene Sommer und somit eine Kontamination der über die Lüftung in das Labor eingetragenen staubigen Außenluft mit den RNasen bodenlebender Mikroorganismen gewesen sein, ein Effekt, der durch den auf dem benachbarten Klinikum regelmäßig landenden Rettungshubschrauber möglicherweise verstärkt wurde.

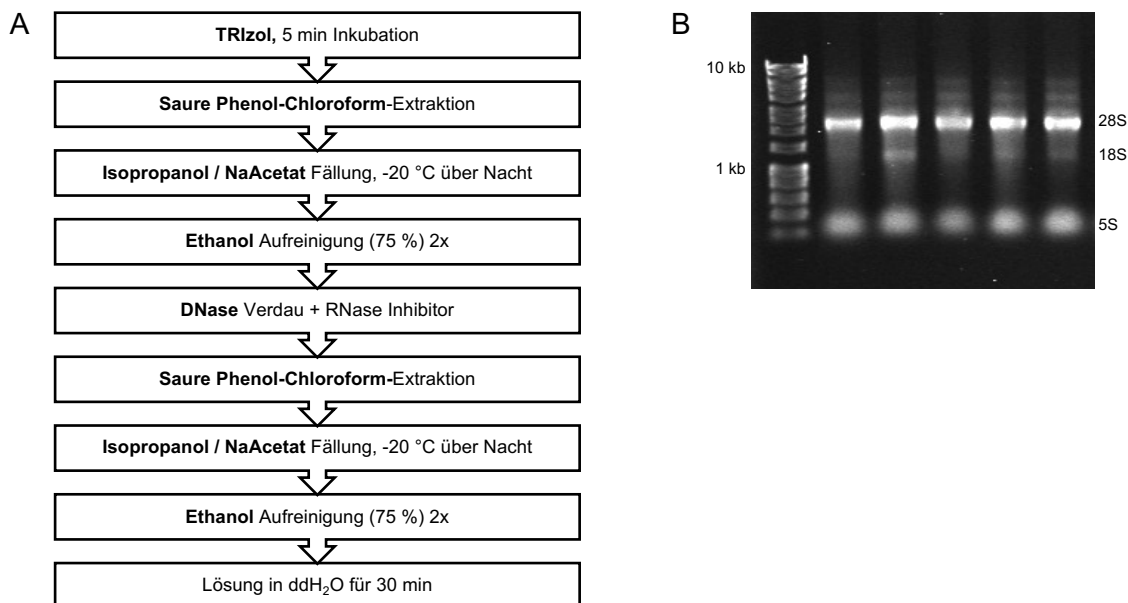


Abbildung 12: **(A)** Protokoll der RNA-Extraktion mit saurem Phenol und DNase-Verdau + RNase Inhibitor; **(B)** 0,8 % Agarosegel mit Gesamt RNA nach Verwendung des Protokolls aus A.

Die 28S rRNA-Bande ist deutlich sichtbar, die 18S Bande ist nur unzureichend sichtbar, was auf eine partielle Degradation der RNA hindeutet.

Infolge der oben beschriebenen Probleme wurden verschiedene Protokolle zur Optimierung der RNA-Integrität und Reinheit getestet.

4.1.3 Neues Protokoll zur RNA-Extraktion: Troubleshooting

Die RNase-hemmende Wirkung des TRIzols sollte in allen neuen Protokollen besser ausgeschöpft werden, weswegen die Inkubationszeit der Zellen in TRIzol von 5 auf 20 min verlängert wurde. Um eine schädigende Wirkung des sauren Phenols auf die Nukleinsäuren zu überprüfen, wurden die erste bzw. beide sauren Phenol-Chloroform-Extraktionen zur Aufreinigung der RNA vor und nach dem DNase-Verdau durch eine Aufreinigung mit Säulen eines RNA-Kits (NEB Monarch RNA Kit) ersetzt (s. Abbildung 13A und 13B). Weiterhin sollte das hausintern doppelt destillierte Wasser mit dem Wasser aus dem NEB Kit im Hinblick auf RNase-Aktivität verglichen werden, nachdem

nur die Säulenaufreinigung nach der TRIzol Inkubation angewendet worden war (s. Abbildung 13C und 13D).

Als Vergleich wurde zum gleichen Zeitpunkt eine Extraktion mit dem ursprünglichen Protokoll (s. Abbildung 12) sowie eine Extraktion mit DNase-Verdau mit anschließender nicht-saurer Phenol-Chloroform-Extraktion vorgenommen (s. Abbildung 13E).

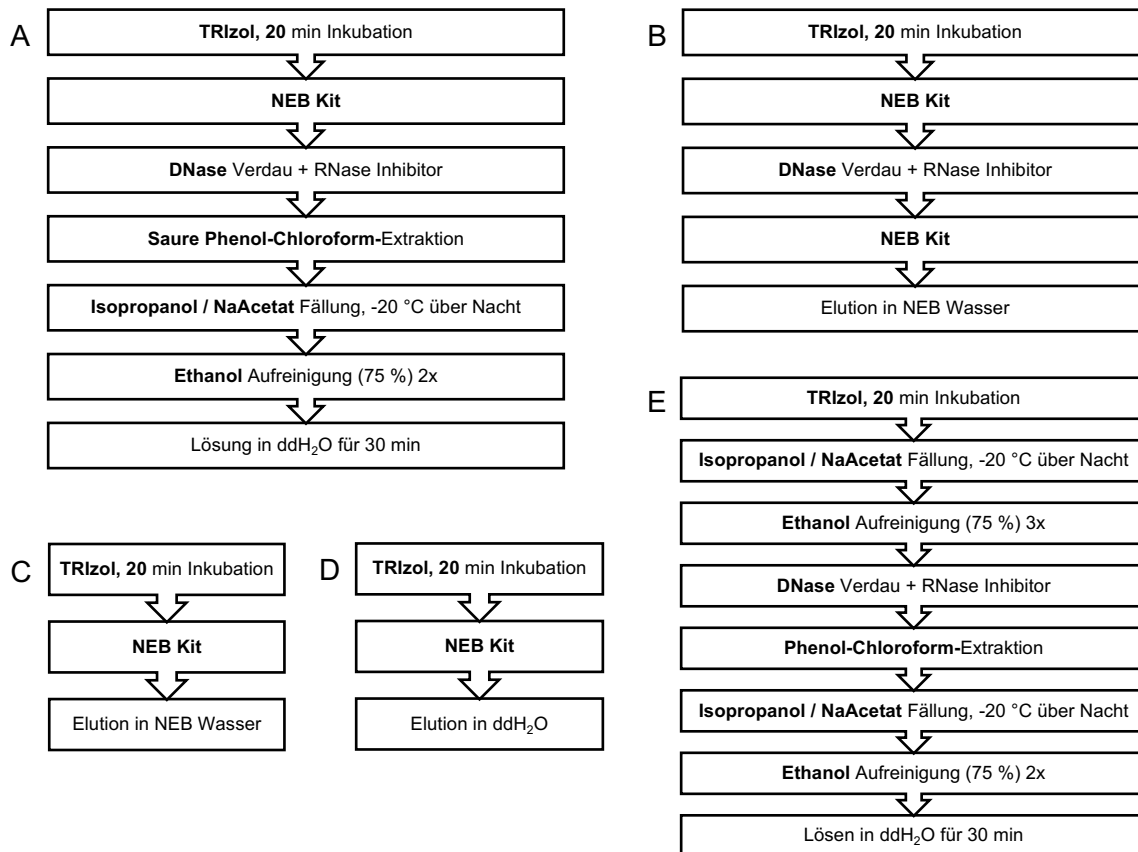


Abbildung 13: Verschiedene Protokolle im Troubleshooting.

(A) Protokoll 1. (B) Protokoll 2. (C) Protokoll 3. (D) Protokoll 4. (E) Protokoll 6. Für genauere Informationen zur Durchführung siehe Text.

Die verschiedenen RNAs wurden auf einem Agarosegel analysiert. Es zeigte sich, dass nach Verwendung von Turbo DNase trotz RNase Inhibitor alle behandelten RNA-Proben partielle oder vollständige Degradation zeigten (s. Abbildung 14). Einzig die ausschließlichen Aufreinigungen mit Säulen des NEB-Kits zeigten deutliche 28S und 18S rRNA Banden, allerdings war dort ein Hintergrund sichtbar, der sowohl auf teilweise degradierte RNA als auch residuale gDNA Fragmente hinweisen könnte. Zwischen den verwendeten Wasserproben, hausintern hergestelltem ddH₂O und NEB Wasser, konnte visuell kein Unterschied festgestellt werden.

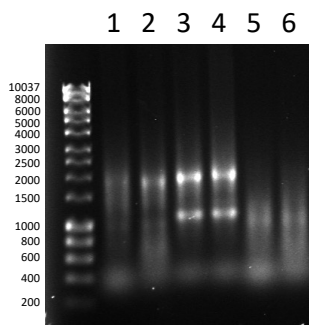


Abbildung 14: 1%iges Agarosegel der Proben 1 - 6 der RNA-Extraktionen nach den im Text beschriebenen Protokollen.

Die Protokolle 1, 2, 3, 4 und 6 sind in Abbildung 13 schematisch dargestellt und im Text beschrieben. Probe 5 entspricht dem ursprünglichen Protokoll mit DNase und zweimaliger saurer Phenol-Chloroform-Extraktion, wie in Abbildung 12A dargestellt. Sichtbar ist die Degradation der Proben, die mit DNase behandelt wurden (1, 2, 5, 6), während die Proben 3 und 4, die nur mit einem RNA-Aufreinigungs-kit behandelt wurden, keine Degradation zeigen. DNA Marker links in bp.

Fazit: Es wurde die Notwendigkeit einer Alternative zum DNase Verdau abgeleitet.

4.1.4 Alternative RNA-Extraktionsprotokolle ohne DNase-Behandlung

Protokolle ohne DNase-Verdau beinhalteten immer TRIzol zur Zellyse und initialer RNase-Denaturierung sowie saures Phenol (pH 4,5) in der Phenol-Chloroform-Extraktion, um genomische DNA aus der RNA-Probe zu entfernen.

Anschließend wurde zwischen der Aufreinigung mittels NEB Kit (Kieselgel-Zentrifugationssäulen) und der Fällung mit Natriumacetat in Isopropanol bzw. Ethanol über Nacht und anschließender Ethanol Aufreinigung des RNA-Pellets unterschieden. Nachdem eventuelle Verunreinigungen der alten Reagenzien durch den Ersatz mit frischen Reagenzien beseitigt wurden, zeigte sich, dass die meisten Protokolle ohne DNase (Abbildung 15A, 15B) deutlichere RNA-Banden auf dem Gel produzierten.

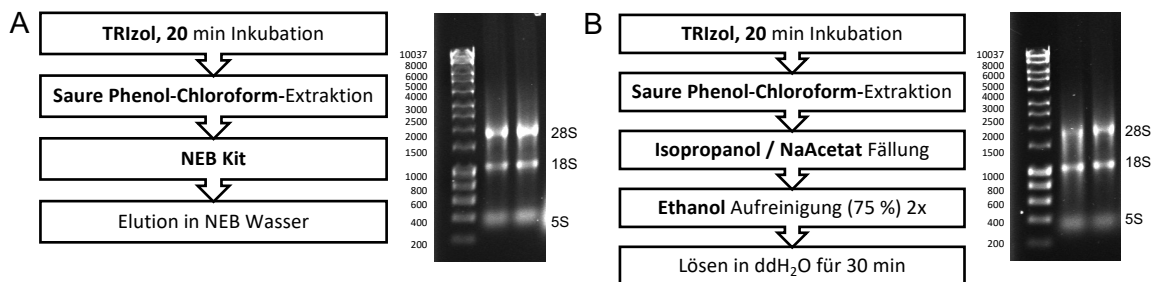


Abbildung 15: RNA-Extraktionen ohne DNase-Verdau mit saurer Phenol-Chloroform-Extraktion.

(A) Protokoll 7: Nach der sauren Phenol-Chloroform Extraktion folgte die Aufreinigung mittels NEB Kit.

(B) Protokoll 8: Nach der sauren Phenol-Chloroform Extraktion folgte die Natriumacetat-Fällung in Isopropanol über Nacht, -20 °C.

(C) Protokoll 9: Natriumacetat-Fällung in Ethanol über Nacht, -20 °C. Protokoll 7 und 8 zeigen klare RNA-Banden, während bei Protokoll 9 die 28S Bande Degradation zeigt. DNA Marker jeweils links in bp.

4.1.5 Untersuchung der RNA auf residuale genomische DNA mittels RT-qPCR

Die RNA-Proben, welche optimale Integrität und Intensität der 28S und 18S Banden auf dem Gel gezeigt hatten (Protokoll 3, 4, 7 und 8), wurden anschließend in einer RT-qPCR auf das Vorhandensein von residuärer gDNA geprüft. Dazu wurde mit einem zuvor validierten Primer Set für den konservierten Teil aller GPR55 mRNA Spleißvarianten (Primer 8 und 9, Primer Set 6) getestet, ob sich in der noRT-Kontrolle eine Amplifikation und eine Schmelzkurve zeigten, was auf die Amplifikation von gDNA hingedeutet hätte.

In Protokoll 3 und 4, bei denen die RNA ausschließlich mit einem NEB Kit mit Säulen nach TRIzol-Inkubation aufgereinigt worden waren, zeigten sich Kontaminationen mit gDNA. In Abbildung 16A und B sind die Amplifikations- und Schmelzkurven dieser RT-qPCRs gezeigt, wo jeweils eine Amplifikationskurve in der noRT-Kontrolle sichtbar ist. Außerdem zeigt sich sowohl bei Protokoll 3 als auch bei Protokoll 4 eine Schmelzkurve mit Temperaturspitze bei ca. 86 °C in der noRT-Kontrolle, die der Schmelzkurve des erwarteten Produktes entspricht. Dies deutet somit auf die Anwesenheit von spezifischen Produkten einer bestimmten Länge und damit Amplifikation von gDNA in der noRT-Kontrolle hin.

In Protokoll 7, in dem sich nach der TRIzol Inkubation eine saure Phenol-Chloroform-Extraktion und Aufreinigung mit einem NEB Kit angeschlossen hatte, konnte keine genomische DNA in der RT-qPCR nachgewiesen werden. Ebenso wurde die gDNA in Protokoll 8 ausreichend entfernt. Infolgedessen zeigten sich in den noRT-Kontrollen keine Amplifikation, wie es die Abbildung 16C mit den RT-qPCR-Ergebnissen für Protokoll 7 zeigt. Bei Protokoll 8 zeigte sich ebenfalls, dass die gDNA ausreichend aus der Probe entfernt worden war, es wurde keine Amplifikation in der noRT-Kontrolle detektiert (s. Abbildung 16D).

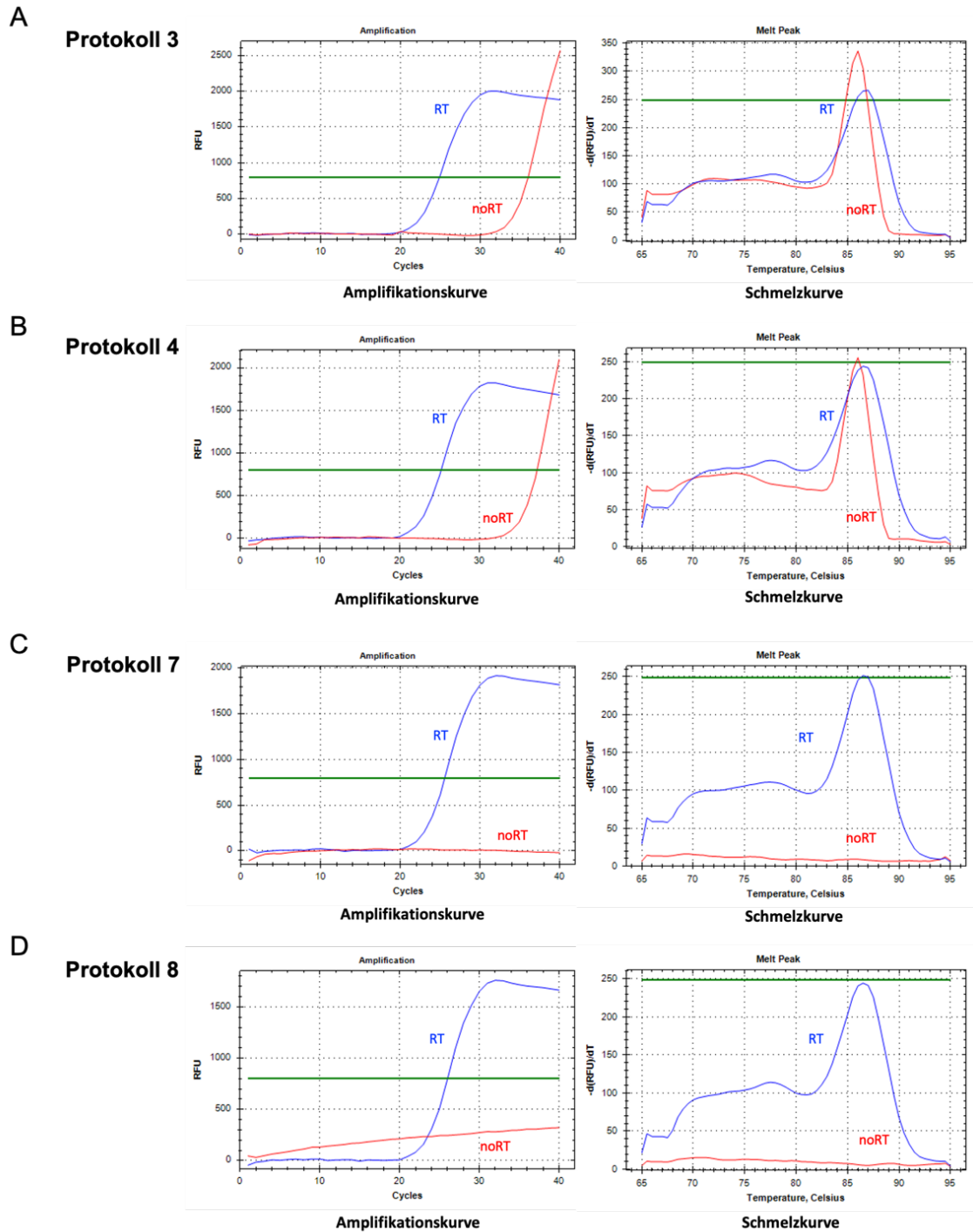


Abbildung 16: Amplifikations- und Schmelzkurven der Protokolle 3, 4, 7 und 8.

Bei Protokoll 3 und 4 zeigt sich jeweils eine Amplifikation in der noRT-Kontrolle (rot), die auf genomische DNA hinweist. Bei Protokoll 7 und 8 findet sich in der noRT-Kontrolle keine Amplifikation, somit ist von gereinigter RNA ohne residuale gDNA auszugehen.

Aufgrund der visuell evaluierten optimalen Ratio von 28S und 18S rRNA im Gel, die sich nach Protokoll 7 besser darstellte als nach Protokoll 8, entschieden wir uns für dieses Protokoll als neue RNA-Extraktionsmethode.

Abschließend wurde die RNA aus Protokoll 7 spektroskopisch untersucht, um sicherzustellen, dass mithilfe der Säulenaufreinigung des NEB Kits Salze, Phenolreste und andere Kontaminationen, die spektroskopisch untersucht werden können, entfernt wurden. Die gemessene 260/280 Ratio für die RNA-Probe betrug 2,06, die 260/230 Ratio wurde mit 2,18 gemessen. Diese liegen somit in den gewünschten Referenzbereichen (260/280 für RNA ca. 2,0, 260/230 Ratio für weitgehend reine Nukleinsäuren 2,0 - 2,2).

Fazit: Aus dem Vergleich verschiedener RNA-Extraktions-Methoden ergibt sich ein neues Standard-Protokoll, was durch Anwendung von TRIzol, einer sauren Phenol-Chloroform-Extraktion (Thermo Fisher, saures Phenol pH 4,5) und Aufreinigung mittels NEB Kit Säulen eine schonende Isolation ausreichender Mengen weitestgehend reiner RNA zulässt. Dabei werden sowohl genomische DNA als auch Reagenzien des Extraktionsprozesses vollständig entfernt. Die 28S und 18S rRNA Banden im Agarosegel zeigen eine visuelle Ratio von ca. 2:1, was für eine hohe RNA-Integrität spricht.

4.1.6 Alternativen zu saurem Phenol von Thermo Fisher Scientific

Aufgrund der Corona-Pandemie und des Krieges in der Ukraine stellten sich bei Thermo Fisher Scientific ab Herbst 2022 Lieferschwierigkeiten ein, die das saure Phenol für die Phenol-Chloroform-Extraktion betrafen. Deswegen musste trotz der Entwicklung eines validierten Protokolls zur RNA-Extraktion (siehe oben) ein alternatives Protokoll ohne saures Phenol von Thermo Fisher etabliert werden, welches für die weiteren Experimente während der Lieferschwierigkeiten verwendet werden konnte.

4.1.6.1 Verdau mit DNase I und rDNase

Zur Auswahl standen verschiedene Präparate von DNase I als Alternativen zur Turbo DNase sowie saure Phenole anderer Hersteller bzw. hausintern angesäuertes Phenol. Die Protokolle mit DNase beinhalteten immer die 20-minütige Behandlung mit TRIzol, die Aufreinigung mittels NEB Kit, eine DNase-Behandlung mit dem entsprechenden Enzym und abschließend eine Aufreinigung mit NEB Kit Säulen bzw. für rDNase mittels eines DNase „removal reagent“ (Abbildung 17).

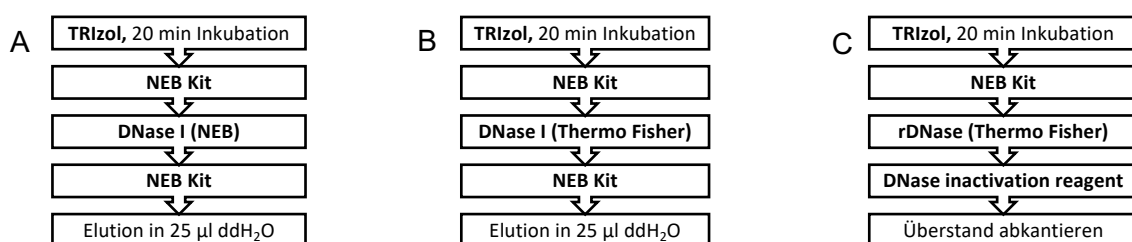


Abbildung 17: Alternative Protokolle mit DNase Behandlung. DNase I von NEB (A), DNase I von Thermo Fisher (B), rDNase mit Inaktivierungsreagenz von Thermo Fisher (C).

Getestet wurden DNase I von NEB, DNase I von Thermo Fisher sowie rDNase mit einem DNase „removal reagent“ von Thermo Fisher. Die Ergebnisse der Protokolle nach der Gelelektrophorese sind in Abbildung 18 zu sehen. Während sich nach der Behandlung mit DNase I von NEB und Thermo Fisher vermehrte Degradation und verschmierte Nukleinsäure im Hintergrund des Gels zeigten, konnten durch die Behandlung mit rDNase und anschließender Anwendung des DNase „removal reagent“ bessere 28S und 18S rRNA Banden visualisiert werden.

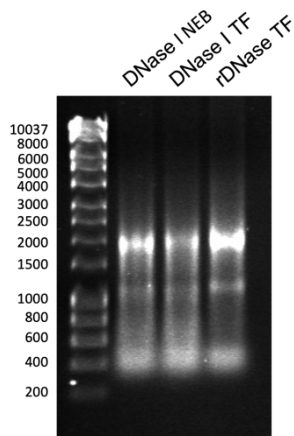


Abbildung 18: RNA-Banden nach Anwendung verschiedener DNasen zur gDNA-Entfernung.

1) DNase I von NEB. 2) DNase I von Thermo Fisher (TF). 3) rDNase mit removal reagent von Thermo Fisher. DNA Marker links in bp.

In der RT-qPCR zeigten sich hohe Ct-Werte und unspezifische Schmelzkurven für die Protokolle mit DNase I von NEB und Thermo Fisher, die auf Degradation mit nicht ausreichend spezifischer Amplifikation des GPR55 Amplikons hindeuten. Bei dem Protokoll mit rDNase ließ sich keine gDNA Kontamination in Form von Amplifikations- und Schmelzkurve der noRT-Kontrolle nachweisen.

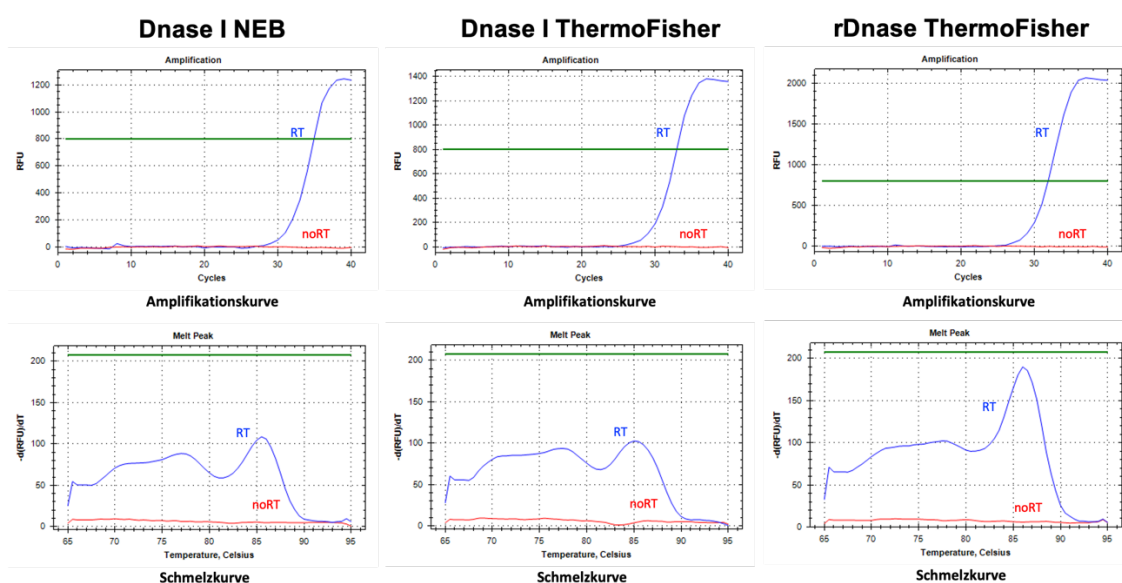


Abbildung 19: RT-qPCR Amplifikations- und Schmelzkurven nach RNA Extraktion unter Verwendung der verschiedenen DNasen.

4.1.6.2 Saures Phenol alternativer Hersteller

Das ursprünglich validierte Protokoll (s. 4.1.4, Protokoll 7) mit saurer Phenol-Chloroform-Extraktion (pH 4,5, Thermo Fisher) und anschließender Aufreinigung mittels NEB Kit sollte mit saurem Phenol anderer Hersteller getestet werden. Problematisch hierbei war, dass die Hersteller keinen genauen pH-Wert, sondern lediglich pH-Bereiche des Phenols angaben. Ein hausintern auf pH 4,5 angesäuertes Phenol wurde ebenfalls getestet. Die Herstellung ist in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben.

Protokoll 7 (Abbildung 15A) wurde mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit saurem Phenol von Roth, Merck und hausintern angesäuertem Phenol durchgeführt und mit den Ergebnissen der Extraktion mit saurem Phenol von Thermo Fisher verglichen. Alle Protokolle zeigten im Agarosegel intakte RNA mit erkennbaren 28S, 18S und 5S rRNA Banden. Die 28S/18S Ratios unterschieden sich visuell jedoch ebenso wie das Auftreten eines unspezifischen Hintergrunds bzw. zusätzlichen Banden im Gel (s. Abbildung 20). Unter Verwendung von saurem Phenol von Roth zeigte sich eine zusätzliche Bande zwischen der 28S und 18S rRNA sowie ein Hintergrund, der auf residuale, teilweise degradierte DNA hinwies. In der RT-qPCR zeigte sich gDNA-Kontamination in Form von Amplifikations- und Schmelzkurven in der noRT-Kontrolle. Das saure Phenol von Merck zeigte im Agarosegel kaum Hintergrund, jedoch nur eine schwache 18S rRNA Bande. In der RT-qPCR konnte keine gDNA in der noRT-Kontrolle nachgewiesen werden. Das hausintern angesäuerte Phenol zeigte im Gel visuell am meisten Hintergrund sowie eine Ratio von 28S/18S rRNA von ca. 1:1. In der RT-qPCR wurde gDNA in der noRT-Kontrolle detektiert. Die Extraktion mit saurem Phenol von Thermo Fisher wurde parallel als Kontrolle durchgeführt und bestätigte die vorherigen Ergebnisse dieses Protokolls mit guten 28S und 18S rRNA-Banden im richtigen Verhältnis, vollständiger Entfernung von gDNA und einer erwarteten Amplifikations- und Schmelzkurve (s. Abbildung 20 und 21).

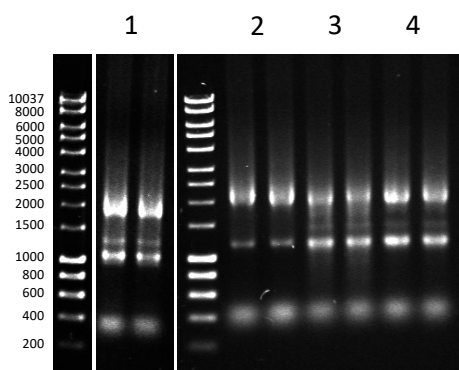


Abbildung 20: RNA-Banden nach Anwendung verschiedener saurer Phenole in der Phenol-Chloroform-Extraktion. 1) Roth. 2) Merck. 3) Hausintern angesäuert. 4) Thermo Fisher. DNA Marker links in bp.

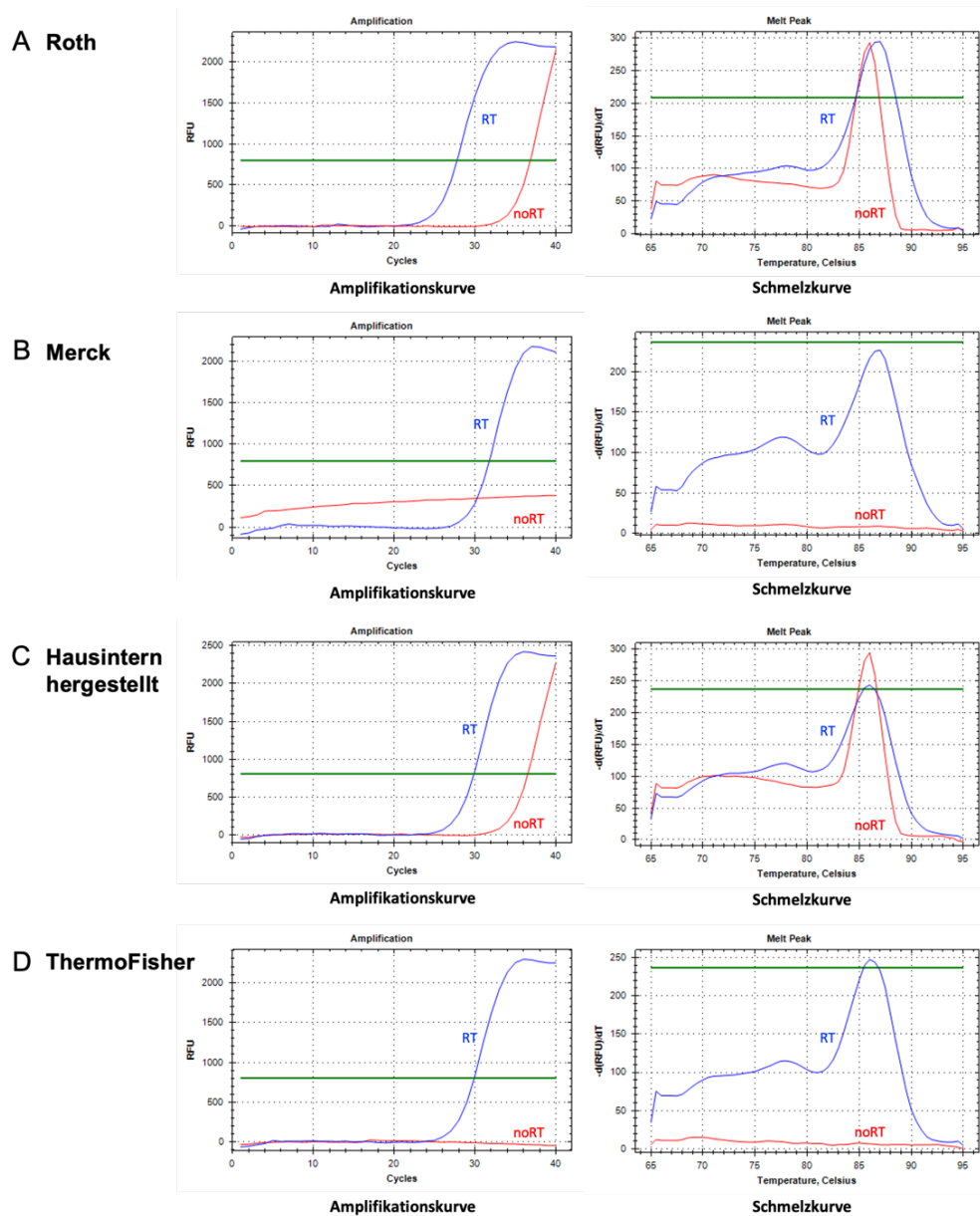


Abbildung 21: RT-qPCR Amplifikations- und Schmelzkurven nach RNA-Extraktion mittels Protokoll 7 unter Verwendung von saurem Phenol verschiedener Hersteller.

In den noRT-Kontrollen (rot) sieht man, dass beim sauren Phenol von Roth (**A**) und aus eigener Herstellung (**C**) die gDNA nicht entfernt werden konnte. Das saure Phenol von Merck (**B**) und von Thermo Fisher (Originalmethode, **D**) zeigten keine Amplifikation in der noRT-Kontrolle, woraus geschlossen wurde, dass dort keine residuale gDNA in der RNA vorlag.

Fazit: Zusammenfassend wurde mit dem sauren Phenol von Roth sowie dem hausintern angesäuerten Phenol die gDNA nicht ausreichend entfernt. Die Behandlungen mit DNase I von NEB und DNase I von Thermo Fisher führten nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen bezüglich der RNA-Integrität in der RT-qPCR.

Da das saure Phenol von Merck und die rDNase mit „removal reagent“ beide die gDNA vollständig entfernen konnten, jedoch lediglich die RNA nach rDNase und „removal

reagent“ eine erfolgversprechendere 28S/18S rRNA Ratio im Agarosegel zeigte (Abbildung 18C), wurde dieses Protokoll als Alternative zum etablierten Protokoll bis zur Nachlieferung nach vollständigem Verbrauch der sauren Phenolbestände von Thermo Fisher geplant.

4.2 Untersuchung der Expression von GPR55 mRNA Spleißvarianten in Huh-7 Zellen

4.2.1 Alignments von GPR55 Gensequenzen und mRNA Spleißvarianten

Interaktionen zwischen lnc-ITM2C-1 und GPR55 mRNA in der Regulationsachse beinhalten möglicherweise die direkte Hybridisierung der lncRNA mit der mRNA und somit eine direkte Beeinflussung der Expression der GPR55 mRNA, zum Beispiel durch ihre Stabilisierung gegen Abbau. Um dies weiter zu untersuchen, wurde geplant sowohl *in silico* Hybridisierungen durchzuführen als auch experimentelle Interaktions-Analysen ("Pulldowns") durchzuführen. Dafür war es wichtig, die genaue Nukleotidsequenz der in den verwendeten Zellen tatsächlich exprimierten Spleißvarianten der (m)RNAs herauszufinden. Die Recherche für GPR55 wurde mithilfe der Datenbanken NCBI (National Center for Biotechnology Information) und Ensembl EBI (European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK) durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Recherche (April 2022) wurden 9 Spleißvarianten der mRNA des G-protein-coupled receptor 55 gefunden (EMBL-EBI, 2022; NCBI, 2022c). Diese Spleißvarianten unterschieden sich in der Anzahl der Basenpaare, in der Anordnung der Exons und Introns sowie in der Wahrscheinlichkeit für eine tatsächliche Expression in humanen Zellen. Wie in Tabelle 2 gelistet, wurde die Variante 1 als die „MANE“ Variante bezeichnet, was für „Matched Annotation in NCBI und Ensembl“ steht. Die Datenbanken Ensembl/GENCODE1 und NCBI/RefSeq2 führten die MANE Collaboration als gemeinsame Initiative ein, um eine hochwertige Sammlung von humanen Genen, Transkripten und korrespondierenden Proteinen bereitzustellen (Morales et al., 2022). Die Variante 1 ist also als MANE in beiden Datenbanken annotiert und wird in der Literatur am häufigsten verwendet. Die anderen Spleißvarianten sind entweder nur in der NCBI-Datenbank (RefSeq) oder nur in Ensembl (GENCODE) gelistet.

Zunächst wurden die FASTA-Sequenzen der gelisteten Transkripte als komplementäre DNAs, kurz cDNAs, aus den Datenbanken entnommen und in das Programm SnapGene eingesetzt. Teilweise wurden von den Datenbanken auch die Lokalisationen der Exongrenzen bereitgestellt, die als Feature in diese Dateien eingefügt werden konnten. Als Bestätigung für eine korrekte Annotierung der Exongrenzen wurden die cDNA-

Sequenzen mit dem Tool „Alignment“ (engl. für „Ausrichtung“ von Sequenzen, aneinander oder an einer Referenz-Sequenz) mit dem gesamten Gen als Referenzsequenz verglichen. Wichtig war hierbei, das Gen als Referenzsequenz zu nutzen und nicht die Varianten untereinander zu vergleichen, da im letzteren Fall beim Alignment eine Aufteilung der Sequenzen durchgeführt worden wäre, die nicht den realen Exongrenzen entspräche.

Auffällig war, dass sich die Gen-Annotationen für GPR55 in NCBI und Ensembl bezüglich Länge und Sequenz leicht unterschieden, was als Folge oder Ursprung der unterschiedlichen Spleißvarianten in beiden Datenbanken gewertet werden könnte (NCBI Gen GPR55: 53.874 bp; Ensembl Gen GPR55: 53.749 bp). Um diese Unterschiede weiter zu untersuchen und einen „Hybrid“ der beiden Annotationen zu entwickeln, wurden auch die Gensequenzen aus NCBI und Ensembl aneinander ausgerichtet („aligned“) und somit abgeglichen. Daraufhin wurde sichtbar, dass die Gensequenz aus NCBI im Vergleich zu der aus Ensembl an einem Ende 135 Basenpaare länger war. Dafür enthielt das auf Ensembl gelistete Gen am anderen Ende 10 zusätzliche Basenpaare (s. Abbildung 22). Um sowohl die Spleißvarianten aus NCBI (1 - 4) als auch Ensembl (1, 5 - 9) in einem Alignment zu einer Gensequenz zu vereinigen, wurde im Programm ein „Hybrid“ der beiden Gensequenzen aus NCBI und Ensembl erstellt, der die jeweiligen Verlängerungen am 5'- und am 3'-Ende einschloss und somit insgesamt eine Länge von 53.884 bp besaß. Zudem wurde zur besseren Übersicht die GPR55-Sequenz im Alignment mit den Spleißvarianten aufgrund der Lokalisation auf dem Reverse-Strang der DNA durch das Tool „Flip sequence“ in Snapgene umgekehrt zur Leserichtung von rechts nach links auf dem Chromosom 2 dargestellt (s. Abbildung 22 und 23). Somit waren die Nukleotide von 1 bis 53.884 in einer Leserichtung von links nach rechts angeordnet.

Die einzelnen cDNA-Sequenzen der Spleißvarianten wurden in einem Alignment mit der Hybrid-Gensequenz zusammengefasst (s. Abbildung 23). Durch das Fehlen der Intronsequenzen in den cDNAs wurden die Exons übersichtlich im Vergleich zur Gensequenz dargestellt und konnten dann untereinander verglichen werden. Zusätzlich wurden die Exon-Intron-Grenzen manuell auf das Vorhandensein der typischen Spleißstellen überprüft, die die Introns begrenzen und während des Spleißprozesses als Angriffsstelle der Spleißosomen dienen. In der prä-mRNA befinden sich endständig in den Introns typischerweise die Nukleotide 5'-GU und AG-3'. Diese kanonischen Spleißstellen konnten in allen gelisteten cDNA-Sequenzen erkannt werden, was die richtige Festlegung der Exons aus den Datenbanken unterstützte. Die Spleißvarianten von Inc-ITM2C-1 wurden in einer separaten Arbeit von M. Khajouei (M.Sc.) untersucht.

Tabelle 2: GPR55 mRNA Spleißvarianten, Daten aus den internationalen Datenbanken NCBI und Ensembl EBI.

Die Nummerierung der Spleißvarianten in dieser Arbeit erfolgte zur verbesserten Übersicht eigenständig bzw. ist aus der vorangegangenen Arbeit (Grahn, 2022) entnommen und repräsentiert nicht die Transkriptbenennung in den Datenbanken. Die offiziellen Annotationen finden sich in der Spalte „Transcript ID“. Einzig die „MANE“ Variante 1 war in beiden Datenbanken zu finden, die restlichen gelisteten Spleißvarianten waren ausschließlich in einer der beiden Datenbanken enthalten. NCBI = National Center of Biotechnology Information. Ens. = Ensembl. MANE = Matched Annotation in NCBI und Ensembl. TSL = Transcript Support Level. EST = Expressed Sequence Tag. CDS = CoDing Sequence.

Spleiß-variante	Länge (bp)	Quelle	Transcript ID	Transcript Support Level	Exons
1 MANE	3844	NCBI; Ens.	NM_005683.4; ENST00000650999.1	MANE Select, Ensembl Canonical	2
2	3918	NCBI	XM_005246952.5	nicht vorhanden	2
3	4196	NCBI	XM_011512175.4	nicht vorhanden	2
4	3843	NCBI	XM_011512176.3	nicht vorhanden	2
5	1523	Ens.	ENST00000392039.2	TSL 2: „A transcript where the best supporting mRNA is flagged as suspect or the support is from multiple ESTs.“	2
6	3828	Ens.	ENST00000392040.5	TSL 5: “A transcript where no single transcript supports the model structure”	2
7	919	Ens.	ENST00000438398.1	CDS 3' incomplete TSL 5: “A transcript where no single transcript supports the model structure”	2
8	2527	Ens.	ENST00000444078.5	Nonsense mediated decay TSL 1: “A transcript where all splice junctions are supported by at least one non-suspect mRNA.”	3
9	2526	Ens.	ENST00000622008.4	TSL 1: “A transcript where all splice junctions are supported by at least one non-suspect mRNA.”	3

Die Datenbank Ensembl stellt zu den gelisteten mRNA Spleißvarianten Informationen zur Qualität und Relevanz von Annotationen bereit, u. a. das „Transcript Support Level“. Dies ist eine Methode zur Hervorhebung der gut und schlecht unterstützten Transkriptmodelle für die Nutzer, basierend auf der Art und Qualität der zur Annotation des Transkripts verwendeten Alignments (EMBL-EBI, 2024). Außerdem werden die annotierten Exongrenzen geprüft. Einige GPR55 Spleißvarianten wurden aufgrund dessen in den folgenden Analysen vernachlässigt, da sie laut der Annotation in der jeweiligen Datenbank bereits Charakteristika aufwiesen, die eine relevant hohe Expression erheblich weniger wahrscheinlich als bei anderen Spleißvarianten machte. Dies betraf Spleißvariante 5, die als suspekt gekennzeichnet war, sowie Spleißvariante 6, bei der laut Ensembl kein tatsächlich gefundenes Transkript die Struktur und die Sequenz bestätigte. Auch Spleißvariante 7 war als Transkript des Gens für die Biosynthese des Proteins als unwahrscheinlich zu erachten, da laut Ensembl die kodierende Region am 3'-Ende verkürzt war und somit das Stoppcodon fehlte. Spleißvariante 8 war am 3'-Ende lediglich ein Basenpaar länger als Spleißvariante 9 und somit in den durchgeführten PCR-Experimenten nicht von letzterer unterscheidbar. Außerdem wurde sie als „Nonsense mediated decay“ gekennzeichnet. Dies bezeichnet laut dem Ensembl Glossar ein Transkript mit einem vorzeitigen Stoppcodon, das wahrscheinlich einem gezielten Abbau unterliegt (EMBL-EBI, 2024). Somit wurde auch diese mRNA in den Expressionsanalysen vernachlässigt. Trotz der niedrigeren Expressionswahrscheinlichkeit der oben beschriebenen Varianten werden diese in den Grafiken der Vollständigkeit halber mit dargestellt (Abbildung 23).

Fazit: Nach der Recherche in den internationalen Datenbanken NCBI und Ensembl EBI wurden 9 Spleißvarianten für GPR55 gefunden. Die Expression der Varianten 5, 6 und 7 war durch die in den Datenbanken hinterlegten Informationen zum "Transcript Support Level" als unwahrscheinlich eingestuft, daher wurden diese Varianten in den weiteren Analysen nicht mehr berücksichtigt. Die Länge der DNA-Sequenzen für das GPR55-Gen unterschied sich in NCBI (53.874 bp) und Ensembl (53.749 bp), sodass für das Alignment aller Spleißvarianten mit dem GPR55 Gen eine Hybridsequenz erstellt wurde (53.884 bp).

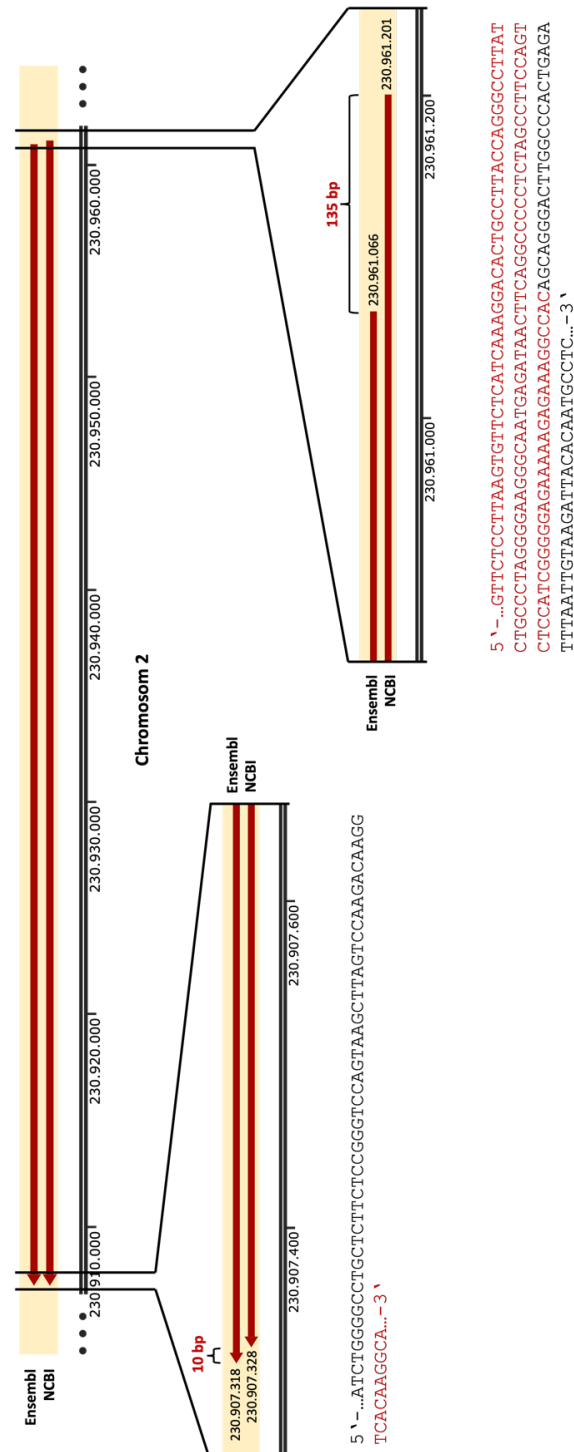


Abbildung 22: Alignment der GPR55 Gensequenzen aus Ensembl EBI (oben) und NCBI (unten) an die Sequenz des Chromosoms 2.

Das GPR55 Gen wird am Reverse-Strang abgelesen und ist deswegen hier in einer Leserichtung von rechts nach links dargestellt. Die Genannotation aus NCBI ist in dieser Darstellung am 3'-Ende 135 Basenpaare länger, dafür enthält die Sequenz aus Ensembl am 5'-Ende 10 zusätzliche Basenpaare. Die abweichenden Sequenzen sind in der Grafik rot markiert, zusätzlich sind die angrenzenden 50 bp dargestellt. Für das nachfolgende Alignment mit den Spleißvarianten wurde ein Hybrid der beiden Gensequenzen erstellt, der die jeweils zusätzlichen Basenpaare am 3'-Ende und 5'-Ende beinhaltet und somit insgesamt eine Länge von 53.885 bp besitzt, welche sich von Position 230.907.318 bis 230.961.201 auf Chromosom 2 erstreckt.

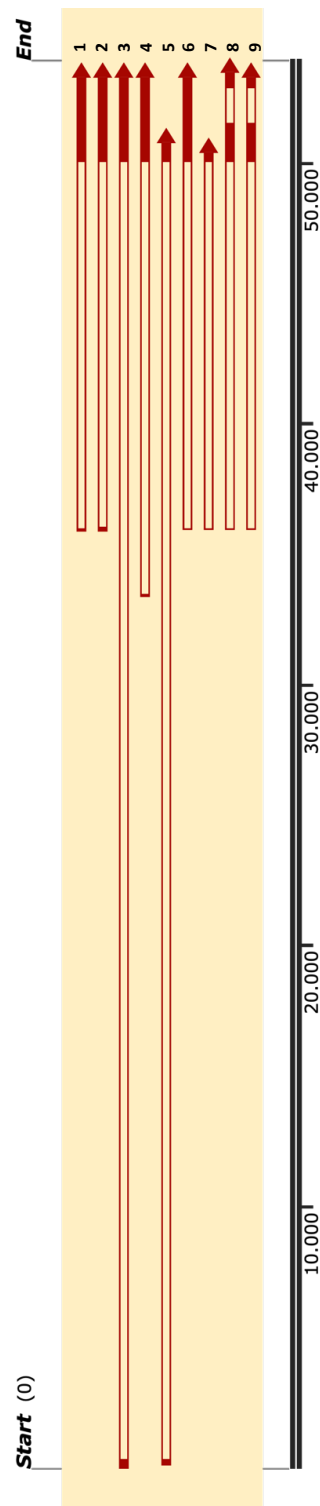


Abbildung 23: Alignment aller cDNAs der gelisteten GPR55 mRNAs an die Hybridsequenz der beiden Gensequenzen aus NCBI und Ensembl mit einer Gesamtlänge von 53.884 bp.

Weil das GPR55 Gen entgegen der Nukleotidnummerierung auf dem Reverse-Strang des Chromosoms 2 abgelesen wird (s. Abbildung 5 und Abbildung 22), wurde die Sequenz für die Darstellung des Alignments umgekehrt. Somit ist die Leserichtung der Nukleotide von 1 bis 53.884 von links nach rechts gezeigt. Die Exons sind in rot dargestellt, die Introns transparent. Die Sequenzen der Spleißvarianten befinden sich im Anhang. Die Namen (Nummerierung) der Sequenzen von 1 bis 9 sind selbst benannt bzw. entnommen aus der Masterthesis von N. Grahn (2022).

4.2.2 Validierung von Varianten-spezifischen Primern an genomischer DNA

Um das Vorhandensein der Spleißvarianten in Huh-7 Zellen durch RT-PCRs bzw. RT-qPCRs zu überprüfen, mussten zunächst Varianten-spezifische Primer hergestellt werden. Wie dabei vorgegangen wurde, wird ausführlich in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben.

Die Spezifität der Primer sollte nach gründlicher Prüfung *in silico* anschließend in einer PCR an genomischer DNA von Huh-7 Zellen bestätigt werden, bevor mit RT-qPCRs die Detektion von mRNA angestrebt wurde. Dafür wurde genomische DNA aus Huh-7 Zellen extrahiert und die Integrität auf einem 0,8%igen Agarosegel bestätigt.

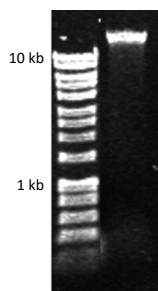


Abbildung 24: Das 0,8%ige Agarosegel zeigt eine DNA-Bande, die länger als 10.000 bp ist, was für eine intakte gDNA spricht.

In einer PCR mit genomischer DNA konnte auf unspezifische Bindungsstellen der Primer im gesamten Genom getestet werden, vorausgesetzt, die Primer überspannten keine Exon-Exon-Grenze („Exon-exon-junction primer“) bzw. das Primer Set band nicht in zwei verschiedenen Exons („Intron-spanning primer set“). Letzteres hätte dazu geführt, dass das Amplikon auf genomischer Ebene Introns enthalten hätte und zu lang für eine Amplifikation in der gegebenen Elongationszeit der PCR gewesen wäre.

Die PCR-Konditionen für die Primer wurden mithilfe eines Gradienten für die Anlagerungstemperatur (engl. annealing temperature), meist zwischen 58 °C und 65 °C, optimiert. Anschließend an die PCR wurde eine Gelelektrophorese der Produkte durchgeführt, um unspezifische Produkte zu visualisieren (beispielhaft dargestellt in Abbildung 25). Die optimale Anlagerungstemperatur war diejenige, bei der die Primer spezifisch an ihre zu amplifizierende Sequenz banden und keine unspezifischen Bindungen ausbildeten. Dabei galt, dass bei höheren Temperaturen Primer spezifischer banden, jedoch durfte die Temperatur nicht zu hoch gewählt werden, da sonst die PCR-Reaktion nicht effizient ablaufen konnte, weil nur eine ungenügende Menge an Primern an ihre Sequenz gebunden hatten. Generell wird eine Anlagerungstemperatur von „Schmelztemperatur minus 2 - 5 °C“ angestrebt. Trotzdem wurde versucht, die Temperatur aufgrund der zunehmenden Spezifität und dem Ziel eines möglichst geringen unspezifischen Hintergrunds so hoch wie möglich zu wählen. Nach der Analyse aller Primer

Sets in PCRs mit Temperaturgradienten wurde eine Anlagerungstemperatur von 62 °C für alle Primer festgelegt. Diese ist zwar höher als die in gängigen Protokollen vorgeschlagene Anlagerungstemperatur von 58 - 60 °C, zeigte jedoch gute Ergebnisse bei allen hier verwendeten Primern, sowohl den kürzeren als auch den längeren Oligonukleotiden. Dies war wichtig, damit die Untersuchungen immer mit allen Primer Sets gleichzeitig zu gleichen experimentellen Bedingungen durchgeführt werden konnten.

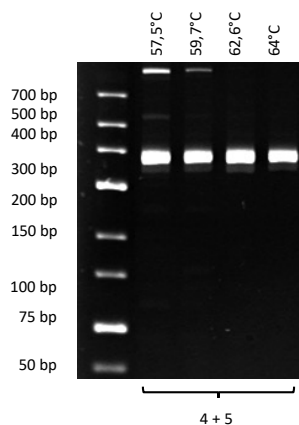


Abbildung 25: Primer Set für Spleißvariante 3 (Primer 4 und 5) mit Temperaturgradient der Anlagerungstemperatur.

An diesem Beispiel ist gut sichtbar, wie die zunehmende Höhe der Anlagerungstemperatur die Spezifität der Primer verbessert. Bei höheren Anlagerungstemperaturen (62,6 °C und 64 °C) liegt nur ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (356 bp) vor, während bei niedrigeren Temperaturen (57,5 °C und 59,7 °C) ein weiteres unspezifisches Produkt > 800 bp amplifiziert wurde.

Aus Voruntersuchungen von Nikolai Grahn (M.Sc.) wurde eine Magnesiumkonzentration von 3 mM in den Endpoint-PCR-Reaktionen übernommen (Grahn, 2022). Die Primerkonzentration wurde im Verlauf nach Testung verschiedener Konzentrationen auf 0,4 µM für die Endpoint-PCR und 0,3 µM für die qPCR festgelegt. Höhere Mengen führten zu Primer-Dimeren und unspezifischen Produkten, niedrigere Mengen zu weniger Ausbeute in der RT-qPCR.

Nachdem die Primer an gDNA getestet worden waren, wurde die Spezifität durch den Nachweis eines einzelnen Produkts mit der erwarteten Länge im Agarosegel bestätigt. Eine Ausnahme stellten die Primer 1 und 16 dar, die Exon-Exon-Grenzen überspannten. Diese konnten nicht an gDNA validiert werden. Bei Primer-Paaren, bei denen Forward (fwd) und Reverse (rev) Primer jeweils in unterschiedlichen Exons lokalisiert waren, also „intron-spanning“ Primer Sets, wurden zusätzliche „Helping Primer“ erstellt, die sich an Sequenzen in den Introns der gDNA anlagerten. So war es möglich, die Funktionalität des Forward und des Reverse Primers zunächst auf gDNA einzeln mittels kürzeren Amplikons zu testen, welche in Kombination mit einem Hilfsprimer geschaffen wurden. Dies betraf die Primerpaare für die Spleißvarianten 2, 3 und 9. Die Anordnung dieser „Helping Primer“ ist am Beispiel der Spleißvariante 2 in Abbildung 26 dargestellt.

Eine ausführliche Darstellung der Gele nach Analyse der Primer Sets mittels PCR mit genomischer DNA ist im Anhang 12.2 zu finden.

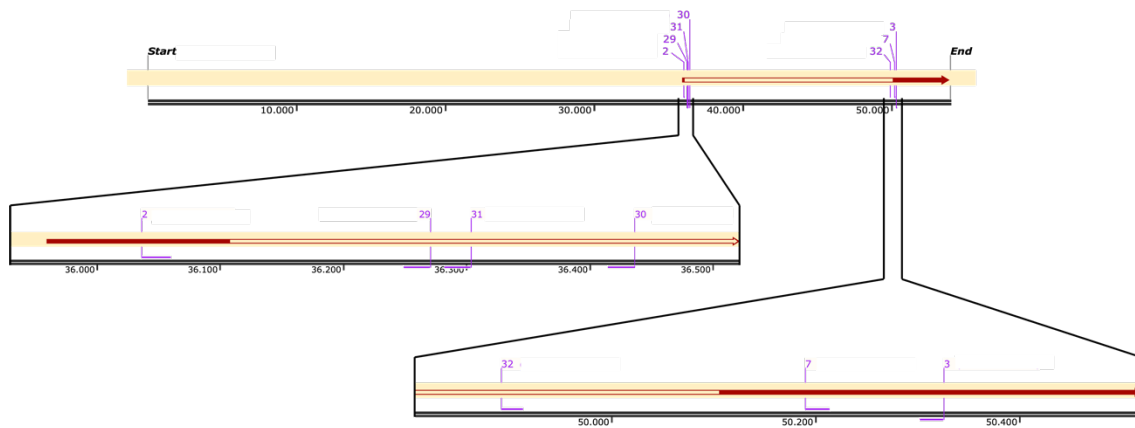


Abbildung 26: Helping Primer am Beispiel der Spleißvariante 2.

Die Primer (lila Balken) 2 (fwd) und 3 (rev) für Spleißvariante 2 sind jeweils in unterschiedlichen Exons (rote Balken) lokalisiert. Deswegen wurden Helping Primer für die Validierung an gDNA erstellt. Für Primer 2 wurden drei Reverse Primer erstellt (29, 30, 31). Primer 3 wurde mit zwei Forward Primern getestet (7, 32).

Fazit: Durch Testung mittels PCR an gDNA und anschließender Gelelektrophorese wurden die Spezifität der Primer sowie die Konditionen der PCR (Anlagerungstemperatur, Primerkonzentration) getestet. Bei Intron-spanning Primer Sets wurden dafür zusätzlich Helping Primer erstellt, die Exon-nah in den angrenzenden Introns lokalisiert waren. Primer, die Exon-Exon-Grenzen in der mRNA überspannten, konnten nicht an gDNA validiert werden.

4.2.3 Endpoint-PCRs mit langen Amplikons

Ursprünglich sollten die Spleißvarianten mithilfe von Endpoint-PCRs identifiziert werden, da diese Methode kostengünstiger ist als die quantitative PCR. Dafür wurden von Nikolai Grahn, der das Projekt im Winter 2021 begonnen hatte, Primer anhand der bereits beschriebenen Kriterien erstellt und diese an gDNA getestet (Grahn, 2022). Die Amplikons dieser vier Primer Sets waren zwischen 292 und 919 Basenpaare lang und eigneten sich deswegen größtenteils nicht für die RT-qPCR, bei der Amplikonlängen von höchstens 400 bp empfohlen werden. Außerdem wurde zusätzlich zu Forward und Reverse Primern ein RT-Primer in der reversen Transkription verwendet, um die RNA möglichst spezifisch zu transkribieren und eine sogenannte „semi-nested“ PCR zu erreichen. Da N. Grahn seine Primer Sets aus Zeitgründen nicht an RNA testen konnte, wurden zunächst diese Primer in RT-PCRs angewendet. Keines der Primer Sets konnte in einer PCR mit 40 Zyklen und jeweils einminütiger Elongation unter Verwendung von Taq-Polymerase spezifische Amplikons der erwarteten Größe nachweisen. Es zeigte sich darüber hinaus, dass die Verwendung von separaten RT-Primern in der reversen Transkription zu vermehrter Bildung von Primer-Dimeren in der PCR führte. Die

Kombinationen wurden folglich verworfen und neue Primer Sets für kürzere Amplikons bis zu einer Länge von 400 bp erstellt, die in der RT-qPCR verwendet werden konnten.

Fazit: Die Primer, die von N. Grahn zu Beginn des Projekts erstellt worden waren und größtenteils lange Amplikons bis 919 bp Länge amplifizieren sollten, zeigten in der Endpoint-PCR keine Amplifikation der erwarteten Produkte. Es wurden daraufhin neue Primer erstellt, um kürzere PCR-Produkte zu amplifizieren. Diese neuen Primer Sets konnten in der RT-qPCR eingesetzt werden. Zudem wurde das Konzept eines separaten Primers in der reversen Transkription aufgrund von vermehrter Primer-Dimer Bildung verworfen und fortan der Reverse Primer der qPCR auch in der RT verwendet.

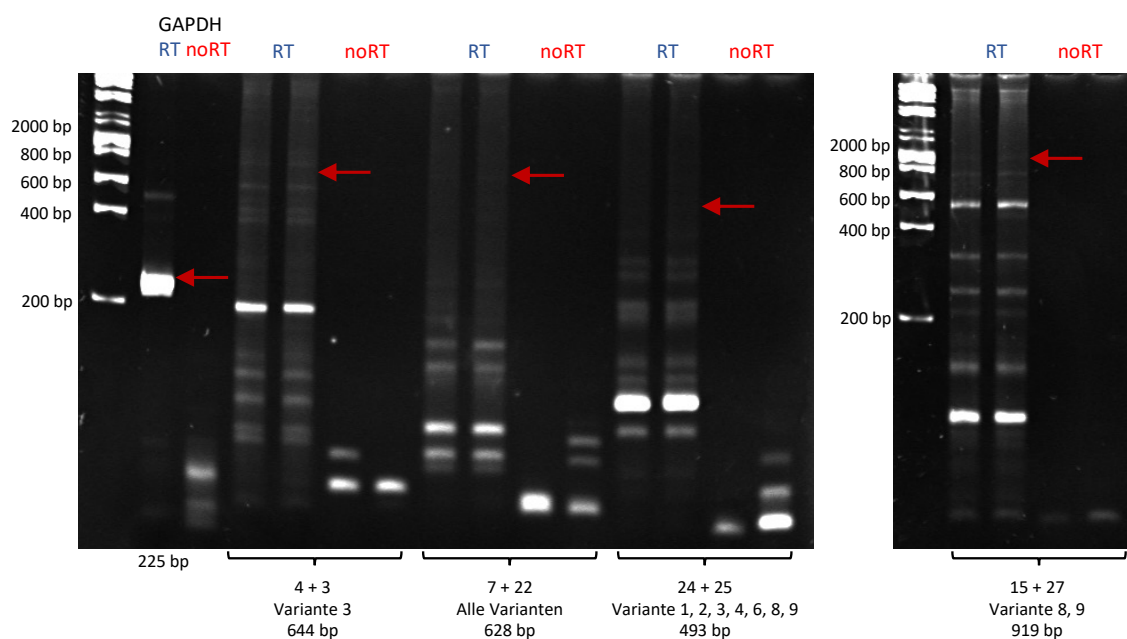


Abbildung 27: Endpoint-PCR mit Primern von N. Grahn.

Vier Primer Sets von N. Grahn mit langen Amplikons wurden in einer RT-PCR mit der Taq-Polymerase (1 min Elongation) getestet. Obwohl alle Sets an gDNA validiert worden waren, zeigte sich keine spezifische Amplifikation, weswegen diese Primer Sets verworfen wurden und neue Primer Sets mit kürzeren Amplikons für eine Untersuchung mittels RT-qPCR erstellt wurden. Rote Pfeile: Erwartete Länge der Amplikons.

4.2.4 RT-qPCRs mit GPR55 mRNA Varianten-spezifischen Primern

Die RT-qPCR bietet im Vergleich zur Endpoint-PCR den Vorteil, dass nicht nur die Endprodukte visualisiert werden können, sondern die Amplifikation der Produkte in Echtzeit aufgezeichnet wird. So kann anhand des Ct-Wertes, des „Threshold cycle“, beurteilt werden, wie hoch die Zielsequenz in der Ausgangsprobe exprimiert ist (s. 3.2.2.14). Darüber hinaus kann eine Schmelzkurve der Produkte angefertigt werden. Dabei werden

nach 40 Zyklen der PCR die Produkte graduell um 5 °C alle 5 s erhitzt. Das Fluoreszenzsignal wird nur von Doppelstrang-DNA emittiert, die bei höheren Temperaturen in einzelsträngige DNA zerfällt, weswegen die Fluoreszenzkurve bei zunehmendem Zerfall der dsDNA abfällt. Es entsteht eine charakteristische Schmelzkurve, die bei Vorhandensein von vielen Produkten der gleichen Länge und Basenzusammensetzung eine Spitze bei entsprechender Schmelztemperatur der Produkte zeigt. Somit zeigt eine einzelne schmale Schmelzkurve an, dass hauptsächlich ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde. Ob dieses dem erwarteten Produkt entspricht, wird anschließend mithilfe einer Acrylamid-Gelelektrophorese anhand der Amplikonlänge überprüft.

Aus den vorherigen Endpoint-PCRs an gDNA und RT-PCRs mit langen Amplikons wurde der Schluss gezogen, keine separaten Gen-spezifischen RT-Primer in der reversen Transkription zu verwenden, um die Möglichkeit für Primer-Dimer-Bildung möglichst gering zu halten. Deswegen wurden als Gen-spezifische Primer (GSP) in der RT jeweils die Reverse Primer verwendet. Außerdem wurden als Vergleich RTs mit „Random Primern“ durchgeführt, die an sehr vielen verschiedenen Stellen im Transkriptom binden und die gesamte mRNA in cDNA umschreiben. Mit Random Primern sollte insgesamt mehr cDNA transkribiert werden, jedoch war die Gefahr der unspezifischen Amplifikation in der nachfolgenden qPCR theoretisch höher. GSP in der RT sollten hingegen nur die mRNA in cDNA umschreiben, die später auch in der qPCR amplifiziert werden sollte. Somit sollte schon in der RT gefiltert und spezifiziert werden, was als cDNA-Ausgangssubstrat für die qPCR diente. Im weiteren Verlauf der Experimente zeigte sich allerdings entgegen obiger Erwartung, dass nach der reversen Transkription mit Random Primern, vermutlich aufgrund der höheren Ausbeute an cDNA, die Amplifikation des erwarteten Produktes in der qPCR spezifischer war und die Menge an unspezifischem Hintergrund deutlich gesenkt wurde. Auch konnten Spleißvarianten mit Primer Sets eindeutig nachgewiesen werden, wo zuvor, nach RT mit GSP, in der nachfolgenden qPCR nur unspezifische Produkte amplifiziert worden waren. Ob dabei die Maxima Reverse Transkriptase von Thermo Fisher oder das cDNA Flex Kit von QuantaBio verwendet wurden, zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus der RT-qPCR und Acrylamid-Gelelektrophorese dieser Primer Sets systematisch vorgestellt und anhand der amplifizierten Produkte die exprimierten Spleißvarianten in Huh-7 Zellen identifiziert. Die Lokalisation der Bindungsstellen der Primer Sets sind jeweils in einem Alignment aller Spleißvarianten dargestellt, dabei sind die Spleißvarianten, die durch diese Primerkombination nicht amplifiziert werden können, transparent dargestellt und die theoretisch nachweisbaren Spleißvarianten in den Vordergrund gerückt. Die einzelnen Primer sind

mit Nummern benannt, die alternativen Namen und die Sequenzen können Kapitel 3.1.8.3 entnommen werden. Auf den Acrylamidgelen ist jeweils mit einem roten Pfeil die Größe des erwarteten Amplikons markiert.

4.2.4.1 Primer Set 1

Primer Set 1 ist „intron-spanning“, d. h. die Primer 1 und 3 liegen in verschiedenen Exons. Es sollte die Varianten 1, 2, 6, 7, 8 und 9 amplifizieren. Die Primer waren einzeln mithilfe von Helping Primern in einer PCR an gDNA auf Funktionalität getestet worden (s. Anhang 12.2.1). In der RT-qPCR konnte jedoch bei Kombination der Primer keine spezifische Amplifikation des erwarteten Produktes nachgewiesen werden. Bei Verwendung eines Random Primers in der reversen Transkription fand keine Amplifikation in der qPCR statt. Wurde der Reverse Primer, also Primer 3, als Gen-spezifischer Primer in der RT verwendet, wurde ein Produkt amplifiziert, was jedoch nicht der erwarteten Länge von 268 bp entsprach. Das Primer Set wurde somit bei Verwendung an RNA als unspezifisch verworfen.

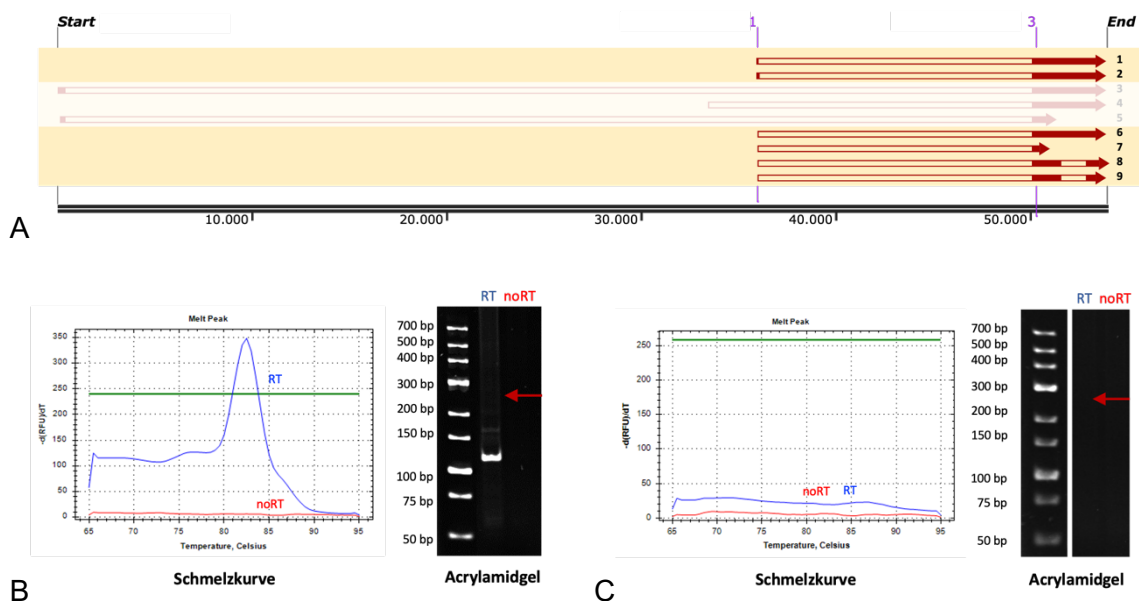


Abbildung 28: Primer Set 1

(A) Lokalisation der Primer 1 und 3 des Primer Sets 1, das die Varianten 1, 2, 6, 7, 8 und 9 amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgelen mit den amplifizierten Produkten sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt. „RT“ = Ansatz mit Reverse Transkriptase bei der Herstellung der cDNA; „noRT“ = Negativ-Kontrolle ohne Reverse Transkriptase.

4.2.4.2 Primer Set 2

Dieses Primer Set war aufgrund der Lokalisation des Forward Primers spezifisch für Spleißvariante 2, die ein einzigartiges erstes Exon besitzt. Auch dieses Set ist „intron-spanning“, somit wurden die Primer einzeln mit Helping Primern an gDNA auf Funktionalität geprüft und diese bestätigt (s. Anhang 12.2.2). In der RT-qPCR konnte sowohl nach reverser Transkription mit Random Primer als auch mit Gen-spezifischem Primer keine Amplifikation des erwarteten Amplikons von 292 bp gezeigt werden. Somit wurde angenommen, dass Spleißvariante 2 nicht exprimiert wird.

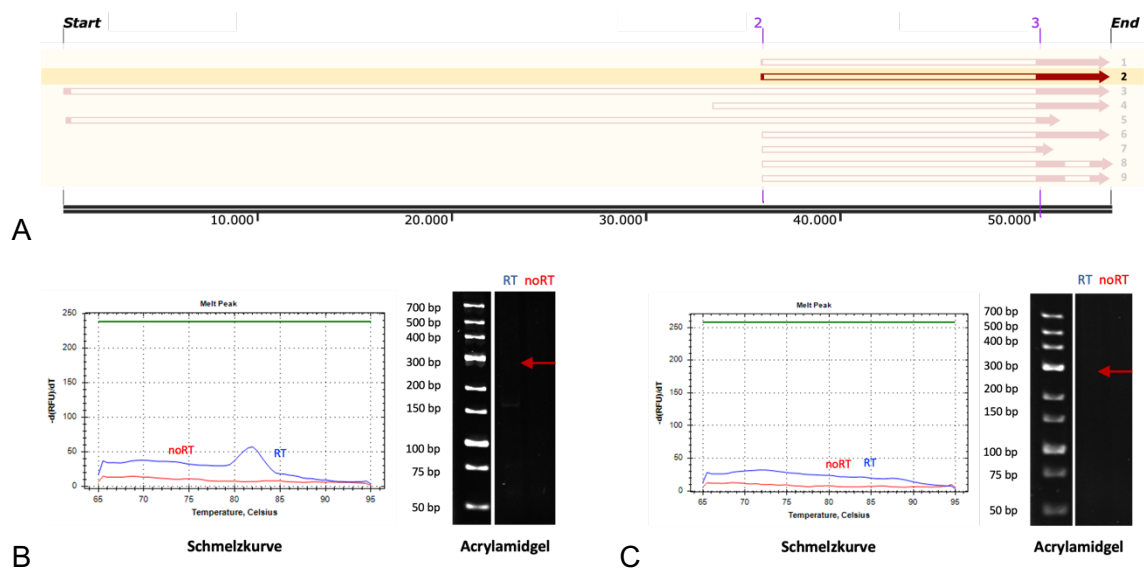


Abbildung 29: Primer Set 2

(A) Lokalisation der Primer 2 und 3 des Primer Sets 2, das spezifisch die Variante 2 amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt. Das erwartete Amplikon von 292 bp konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2.4.3 Primer Set 3

Spleißvariante 3 weist ein einzigartiges 5'-Ende auf, was nur auf die Genannotation von NCBI, nicht jedoch aus Ensembl EBI, aligned werden konnte und somit besonderes Interesse erzeugte. Bei Verwendung des Reverse Primers als Gen-spezifischem Primer in der RT wurde in der qPCR kein Produkt amplifiziert (s. Abbildung 30B). Jedoch konnte nach RT mit einem Random Primer das erwartete Amplikon mit einer Länge von 356 bp nachgewiesen werden (s. Abbildung 30C). Somit wurde gezeigt, dass die Spleißvariante 3 in den Zellen exprimiert wird.

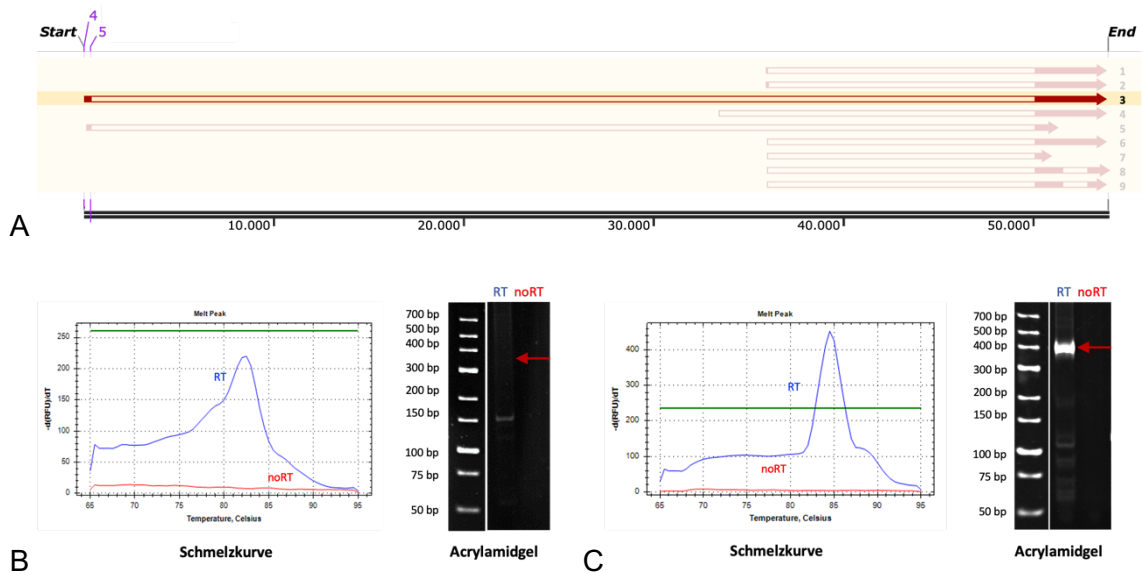


Abbildung 30: Primer Set 3

(A) Lokalisation der Primer 4 und 5 des Primer Sets 3, das die Variante 3 amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele mit den amplifizierten Produkten von 356 bp sind für die RT-qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt. Erst nach RT mit Random Primer wird das erwartete Produkt amplifiziert.

4.2.4.4 Primer Set 4

Zur Bestätigung obiger Ergebnisse für die Spleißvariante 3 wurde ein weiteres Primer Set mit einem alternativen Reverse Primer entworfen. Damit konnten eine eingipfelige Schmelzkurve sowie ein qPCR-Produkt der erwarteten Länge von 111 bp sowohl mit Random Primer als auch mit Gen-spezifischem Primer in der RT nachgewiesen werden. Die Expression von Spleißvariante 3 wird somit als bestätigt angenommen. Dies bestätigt darüber hinaus die GPR55 Genannotation aus NCBI, da nur diese Annotation die Sequenz der nachgewiesenen Spleißvariante im 3'-Bereich des GPR55-Gens abdeckt.

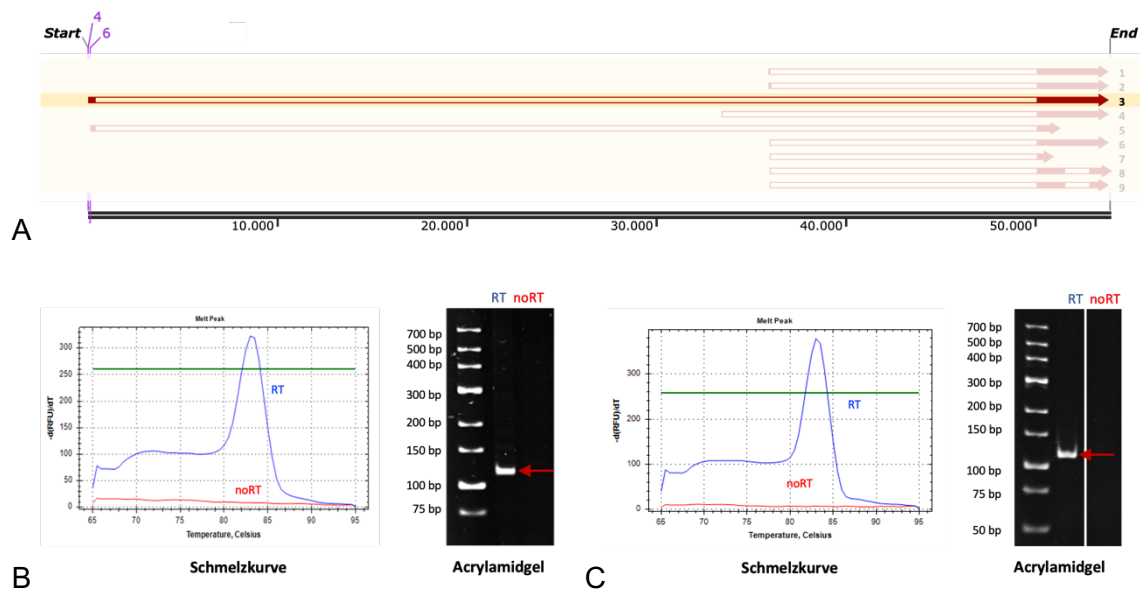


Abbildung 31: Primer Set 4

(A) Lokalisation der Primer 4 und 6 des Primer Sets 3, das die Variante 3 amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgelle mit den amplifizierten Produkten von 111 bp sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt.

4.2.4.5 Primer Set 5

Dieses Set ist im konservierten Teil der GPR55 mRNA lokalisiert, alle Spleißvarianten werden von diesem Primerpaar abgedeckt. In der RT-qPCR zeigte sich eine Schmelzkurve mit deutlicher Spitze und in der Acrylamid-Gelelektrophorese das erwartete Produkt mit einer Länge von 136 bp. Dabei war die Schmelzkurve mit Random-Primer-generierter cDNA wieder schärfer als mit Gen-spezifischen RT-Primern und die Bande im Gel erschien etwas kräftiger (Abbildung 32C).

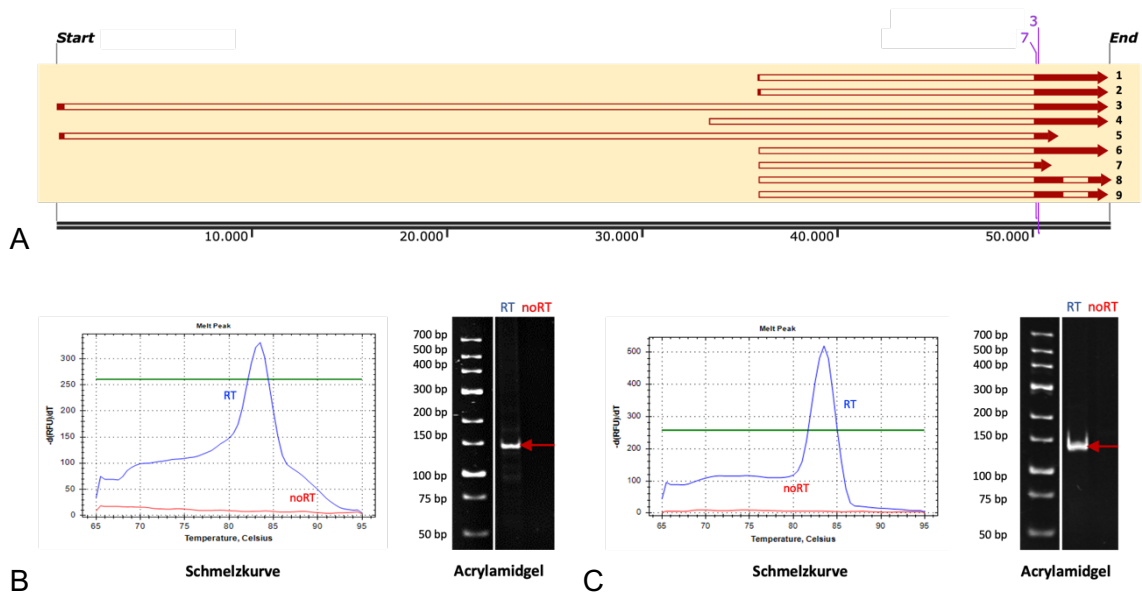


Abbildung 32: Primer Set 5

(A) Lokalisation der Primer 7 und 3 des Primer Sets 5, das eine gemeinsame Sequenz aller Varianten amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele mit den amplifizierten Produkten von 136 bp sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt.

4.2.4.6 Primer Set 6

Dieses Primer Set amplifiziert ebenfalls ein Produkt im konservierten Bereich der GPR55 mRNA. Die Primer wurden erstellt von Pan Hu, die 2019 die Publikation verfasste, auf welcher die Untersuchungen aufbauen (Hu et al., 2019). Es zeigte sich anhand von Schmelzkurve und Acrylamid-Gelelektrophorese die spezifische Amplifikation des erwarteten Produkts einer Länge von 123 bp. Auch hier zeigte das qPCR-Produkt aus Random-Primer-generierter cDNA wieder eine spitzere Schmelzkurve und eine stärkere Bande im Acrylamidgel (s. Abbildung 33C).

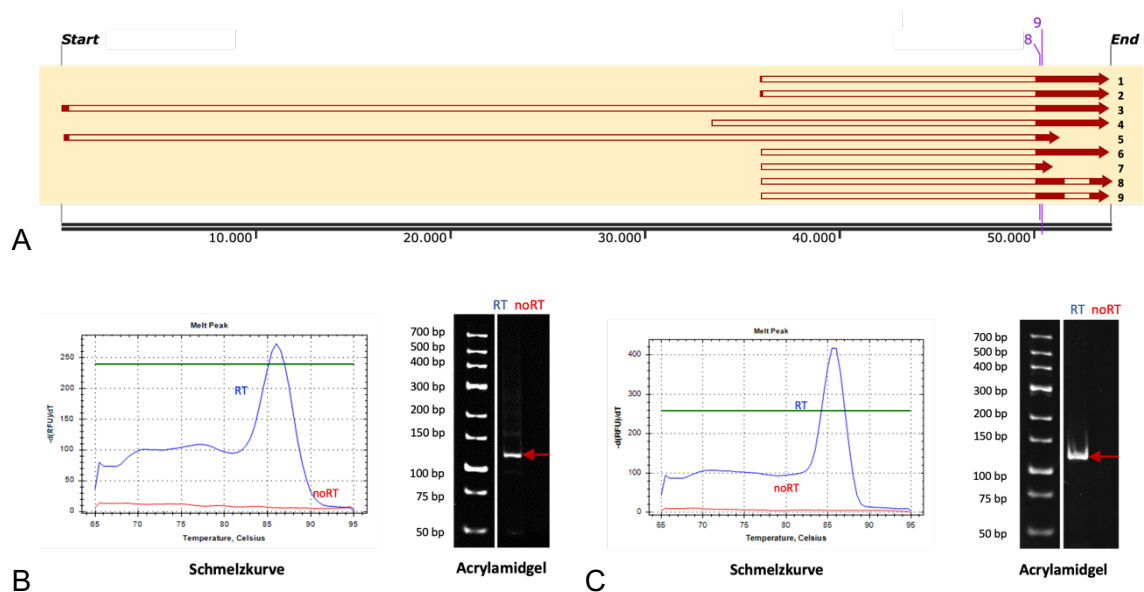


Abbildung 33: Primer Set 6

(A) Lokalisation der Primer 8 und 9 des Primer Sets 6, das eine gemeinsame Sequenz aller Varianten amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele mit den amplifizierten Produkten von 123 bp sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt.

4.2.4.7 Primer Set 7

Diese Primer produzieren ein Amplikon ebenfalls in der konservierten Region der GPR55 mRNA. Es konnten sowohl die Schmelzkurve, die durch eine eindeutige Spitze auf ein einzelnes Produkt hinwies, als auch das erwartete Produkt von 97 bp Länge in der Acrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

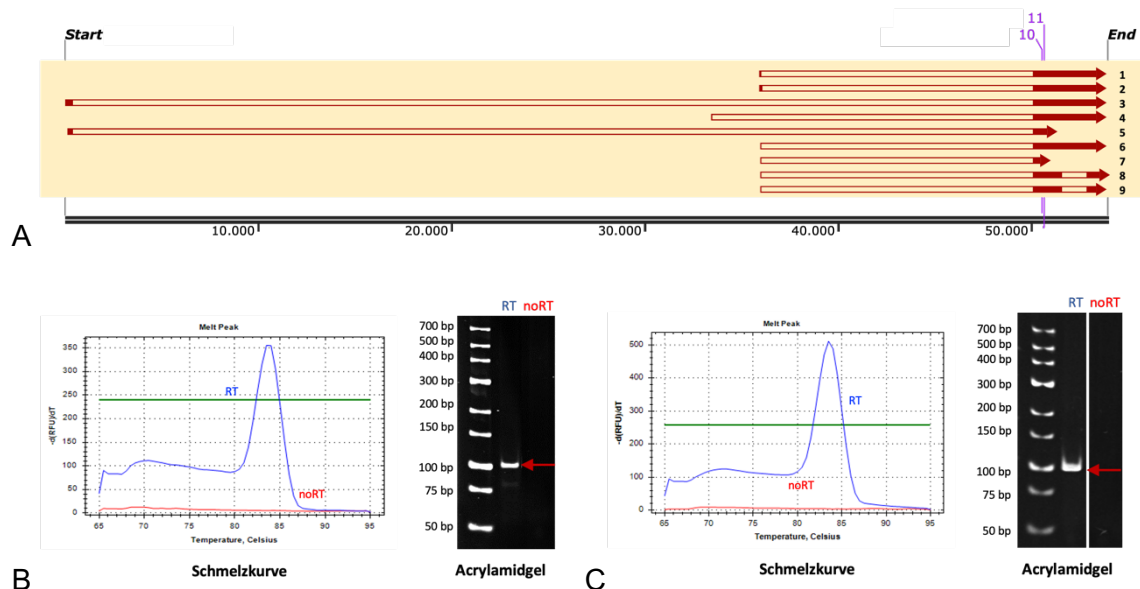


Abbildung 34: Primer Set 7

(A) Lokalisation der Primer 10 und 11 des Primer Sets 7, das eine gemeinsame Sequenz aller Varianten amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele mit den amplifizierten Produkten von 97 bp Länge sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt.

4.2.4.8 Primer Set 8

Primer Set 8 deckt ebenfalls den konservierten Bereich der GPR55 mRNA ab. Auch hier zeigte sich eine Amplifikation des erwarteten Produkts mit einer Länge von 87 bp in der RT-qPCR sowohl bei Verwendung von GSP als auch von Random Primer in der RT.

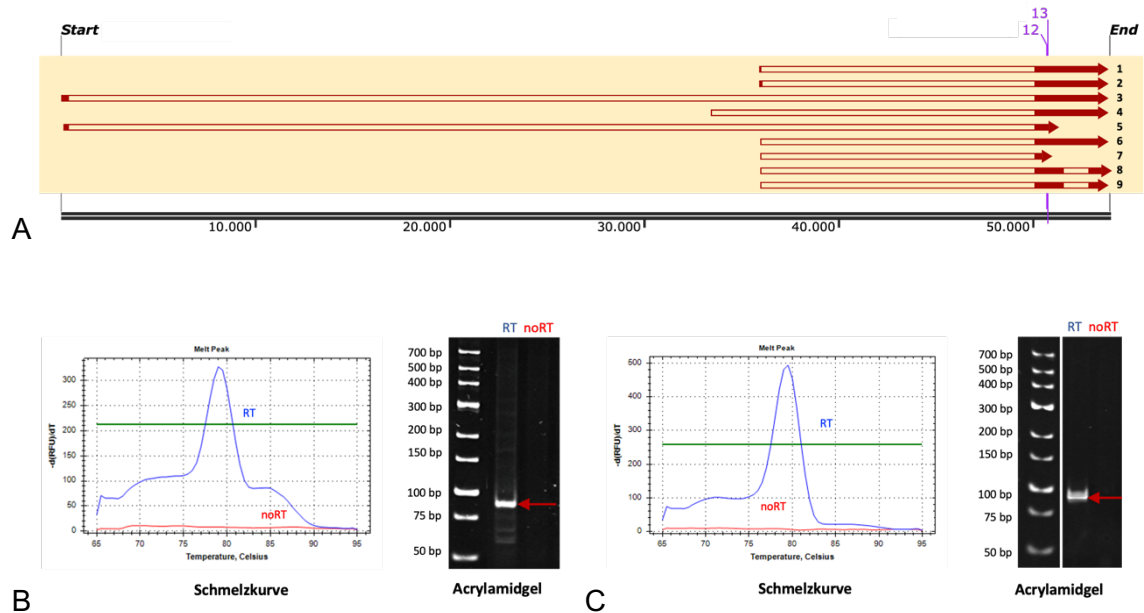


Abbildung 35: Primer Set 8

(A) Lokalisation der Primer 12 und 13 des Primer Sets 8, das eine gemeinsame Sequenz aller Varianten amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte mit 87 bp Länge sowie die Acrylamidgelle mit den amplifizierten Produkten sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt.

4.2.4.9 Primer Set 9

Primer Set 9 deckt die Spleißvarianten 8 und 9 ab, wobei Variante 8 nur ein Nukleotid länger ist als Variante 9. Beide besitzen jedoch ein zweites Intron. Deswegen wurden die Primer 15 und 18 so erstellt, dass sie „intron-spanning“, also in zwei verschiedenen Exons lokalisiert, sind. Bei Vorhandensein der Spleißvariante 8 oder 9 wäre somit das amplifizierte Produkt durch Aussparung des Introns wesentlich kürzer (199 bp) als bei den anderen Varianten (1510 bp), letzteres würde in der RT-qPCR mit einer Elongationszeit von 30 s nicht amplifiziert werden. In der RT-qPCR zeigte sich keine spezifische Amplifikation, weder nach einer RT mit Random Primer noch mit Gen-spezifischem Primer. Somit spricht dies gegen die Expression von Variante 8 und 9.

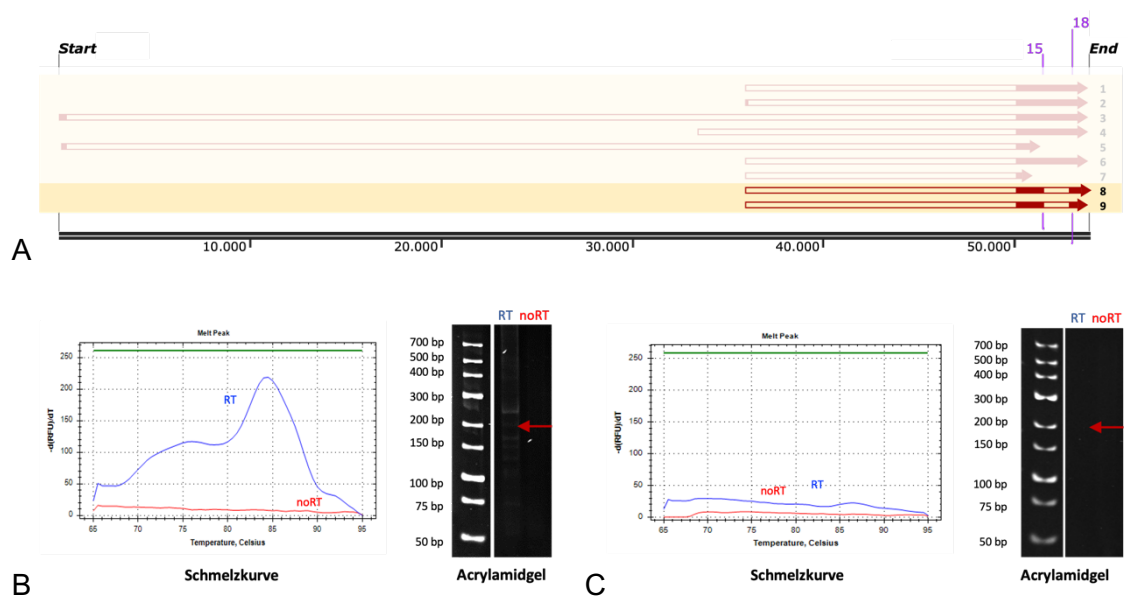


Abbildung 36: Primer Set 9

(A) Lokalisation der Primer 15 und 18 des Primer Sets 9, das die Varianten 8 und 9 amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt. Es wurde keine spezifische Amplifikation des erwarteten Produkts von 199 bp Länge detektiert.

4.2.4.10 Primer Set 10

Der Forward Primer 14 ist ein Exon-Exon-Junction Primer, d. h. er spannt sich über eine Exon-Exon-Grenze. Somit werden nur die Varianten 1, 6, 7, 8 und 9 mit der entsprechenden Spleißstelle amplifiziert. Die Expression der Varianten 6, 7 und 8 ist laut dem Transcript Support Level von Ensembl als unwahrscheinlich eingestuft. Durch die Ergebnisse von Primer Set 9, 11 und 12 ist die Expression der Varianten 8 und 9 sehr unwahrscheinlich, weswegen Primer Set 10 indirekt am ehesten als spezifisch für Variante 1, die MANE Variante, zu betrachten ist.

Es zeigt sich in der RT-qPCR eine spezifische Amplifikation durch eine Schmelzkurve mit einzelndem schmalen Peak und in der Acrylamid-Gelelektrophorese das erwartete Produkt von 230 bp, was eine Expression der Variante 1 bestätigt. In der noRT-Kontrolle zeigt sich ebenfalls eine Amplifikation bei hohen Ct-Werten und eine Schmelzkurve bei niedrigeren Temperaturen, was zusammen mit einem sichtbaren kurzen Produkt im Gel für die Bildung von Primer-Dimeren bei Abwesenheit von cDNA spricht. Da diese Primer-Dimere jedoch in der RT Probe nicht in der Schmelzkurve oder im Gel sichtbar sind, scheinen sie nicht mit der Amplifikation der cDNA in der qPCR zu interferieren.

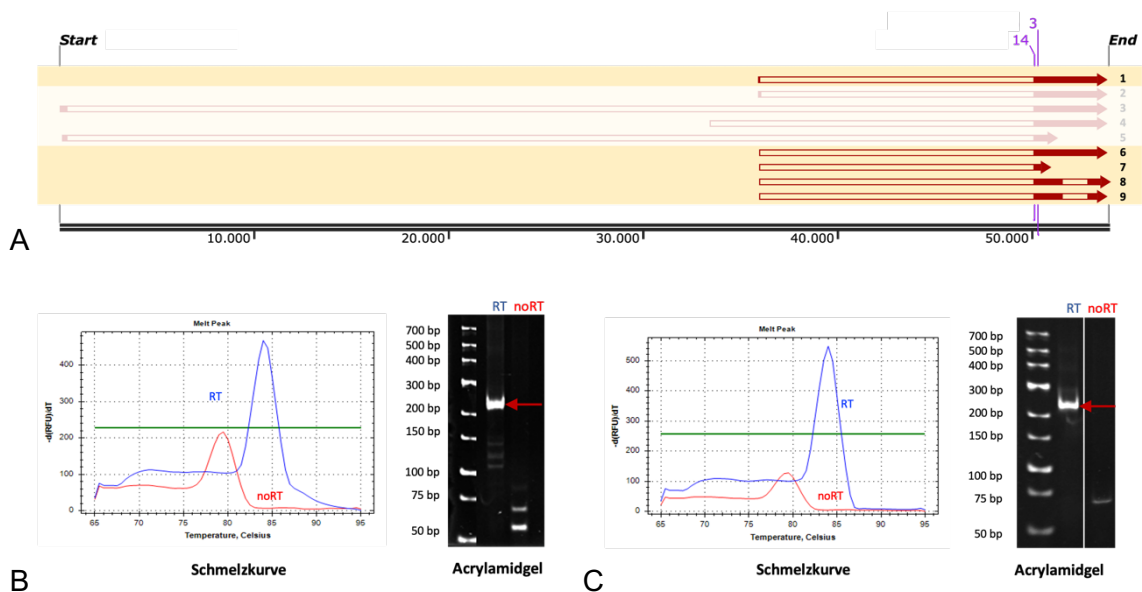


Abbildung 37: Primer Set 10

(A) Lokalisation der Primer 14 und 3 des Primer Sets 10, das die Varianten 1, 6, 7, 8 und 9 amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele mit den amplifizierten Produkten einer Länge von 230 bp sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt.

4.2.4.11 Primer Set 11

Auch Primer Set 11 beinhaltet einen Forward Primer, der sich über eine Exon-Exon-Grenze erstreckt (Primer 16). Da diese aufgrund des einzigartigen Introns nur in den Varianten 8 und 9 vorhanden ist, ist dieses Primer Paar spezifisch für diese Varianten. Es zeigte sich weder mit Random Primer noch mit Gen-spezifischem Primer in der RT eine spezifische Amplifikation des erwarteten Produkts von 168 bp. Zwar ist eine Amplifikation in der qPCR zu sehen, jedoch spricht die verbreiterte und zweigipfelige Schmelzkurve zusammen mit dem Vorhandensein sehr vieler unspezifischer Produkte im Acrylamidgel für die Amplifikation vieler unspezifischer Produkte. Zusammen mit dem negativen Ergebnis von Primer Set 9 wird somit angenommen, dass die Varianten 8 und 9 nicht exprimiert werden.

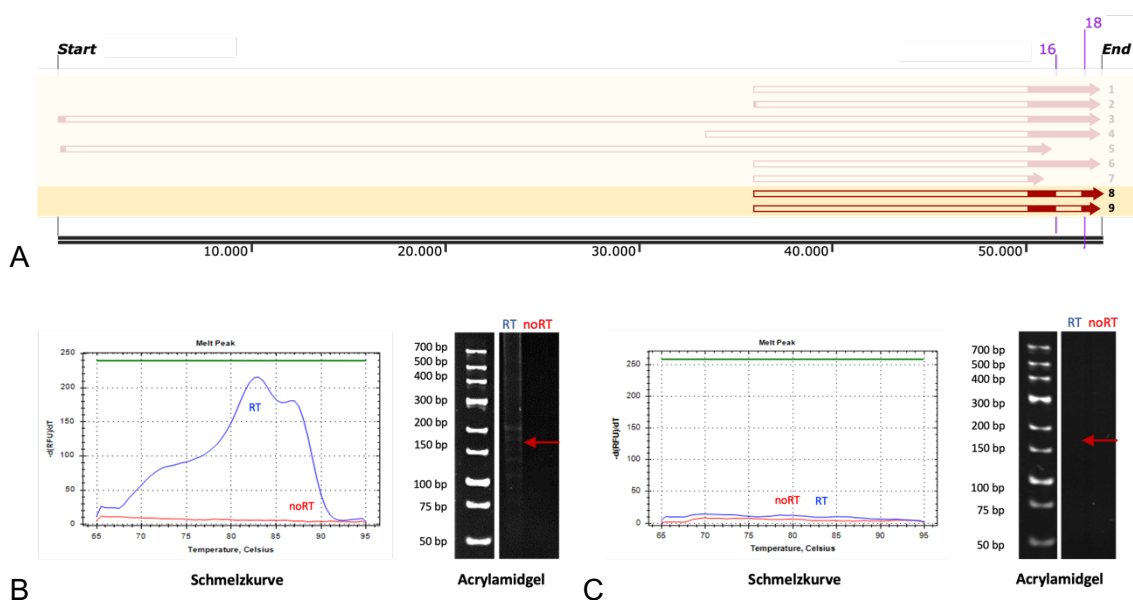


Abbildung 38: Primer Set 11

(A) Lokalisation der Primer 16 und 18 des Primer Sets 11, das die Varianten 8 und 9 amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt. Das erwartete Amplikon von 168 bp Länge (roter Pfeil) wurde nicht detektiert.

4.2.4.12 Primer Set 12

Primer Set 12 beinhaltet einen Forward Primer, der im zweiten Intron der Spleißvarianten 8 und 9 lokalisiert ist und bei Amplifikation eines spezifischen Produkts für die Varianten 1, 2, 3, und 4 spricht, da die Expression der Varianten 5, 6 und 7 nach dem TSL als unwahrscheinlich gilt. Es zeigt sich die spezifische Amplifikation des Produktes von 243 bp Länge in der Schmelzkurve und in der Acrylamid-Gelelektrophorese, was für die Expression der Varianten 1, 2, 3 und/oder 4 spricht. Auch hier überzeugt die RT-qPCR mit Random-Primer-generierter cDNA (C), da die Schmelzkurve schärfer ist und nicht, wie mit Gen-spezifischem RT-Primer (B), unspezifische Banden im Gel sichtbar sind.

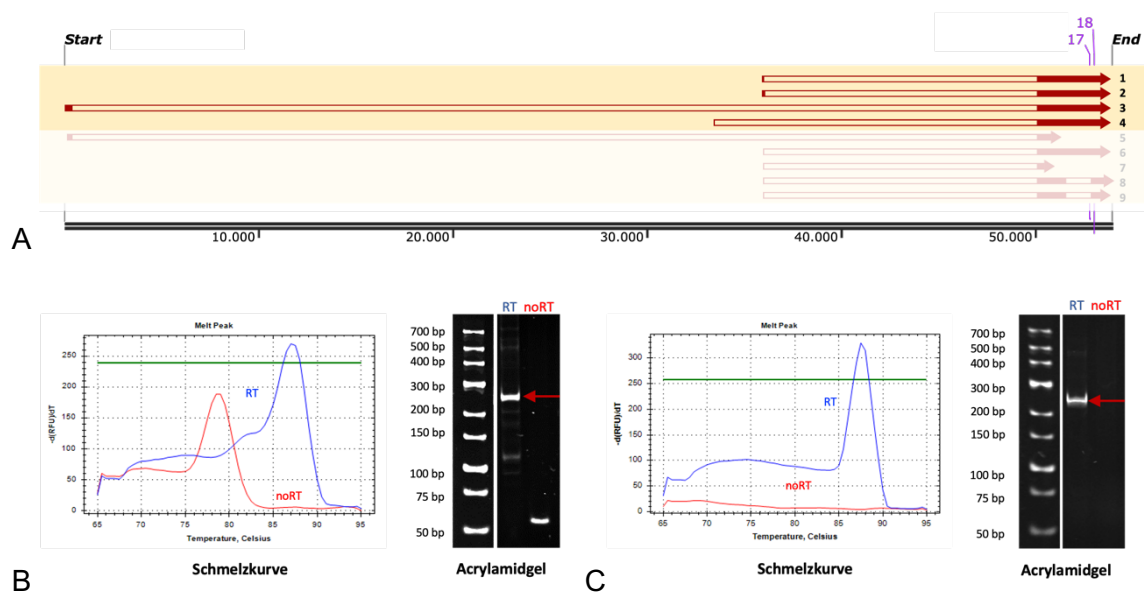


Abbildung 39: Primer Set 12

(A) Lokalisation der Primer 17 und 18 des Primer Sets 12, das nach Ausschluss der Varianten 5, 6, und 7 durch das TSL, die Varianten 1, 2, 3 und 4 amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele mit den amplifizierten Produkten einer Länge von 243 bp sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt.

4.2.4.13 Primer Set 13

Um spezifisch die Expression von Spleißvariante 4 untersuchen zu können, wurden zwei Forward Primer im ersten Exon dieser Variante entwickelt (19 + 20) und jeweils mit Primer 3 kombiniert, der in Exon 2 aller Varianten lokalisiert ist. Somit ergaben sich die Primer Sets 13 und 14, die das Intron der Variante aussparten und spezifisch für Spleißvariante 4 waren. Die Forward Primer wurde jeweils mit zwei Helping Primern (33 + 34) an gDNA validiert. In der RT-qPCR zeigte sich mit der Kombination der Primer 19 und 3 nach RT mit Gen-spezifischem Primern eine Amplifikation eines Produktes, was jedoch nicht der erwarteten Länge von 287 bp entsprach. Im Vergleich zu GAPDH (225 bp) ist das kurze Produkt auf dem Acrylamidgel auf ca. 220 - 230 bp abschätzbar. Mit cDNA aus einer RT mit Random Primer zeigte sich keine Amplifikation, was somit gegen eine Expression von Spleißvariante 4 spricht.

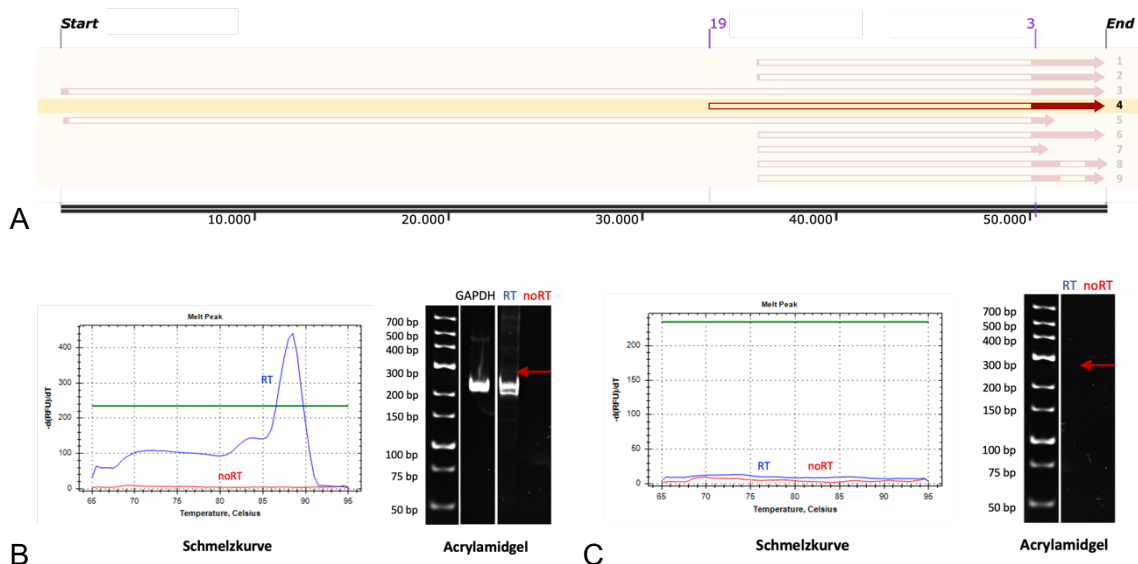


Abbildung 40: Primer Set 13

(A) Lokalisation der Primer 19 und 3 des Primer Sets 13, das spezifisch die Variante 4 amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele mit den amplifizierten Produkten sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt. Das erwartete Amplikon mit einer Länge von 287 bp wurde nicht detektiert.

4.2.4.14 Primer Set 14

Primer Set 14 ist wie Primer Set 13 spezifisch für Spleißvariante 4. Es wird ein anderer Forward Primer verwendet (Primer 20), dessen Bindungsstelle ebenfalls in Exon 1 der Variante 4 lokalisiert ist. Es zeigt sich weder mit cDNA aus Gen-spezifischer RT noch mit RT unter Verwendung eines Random Primers eine Amplifikation des erwarteten Produktes von 244 bp. Somit wurde geschlossen, dass Spleißvariante 4 nicht exprimiert wird.

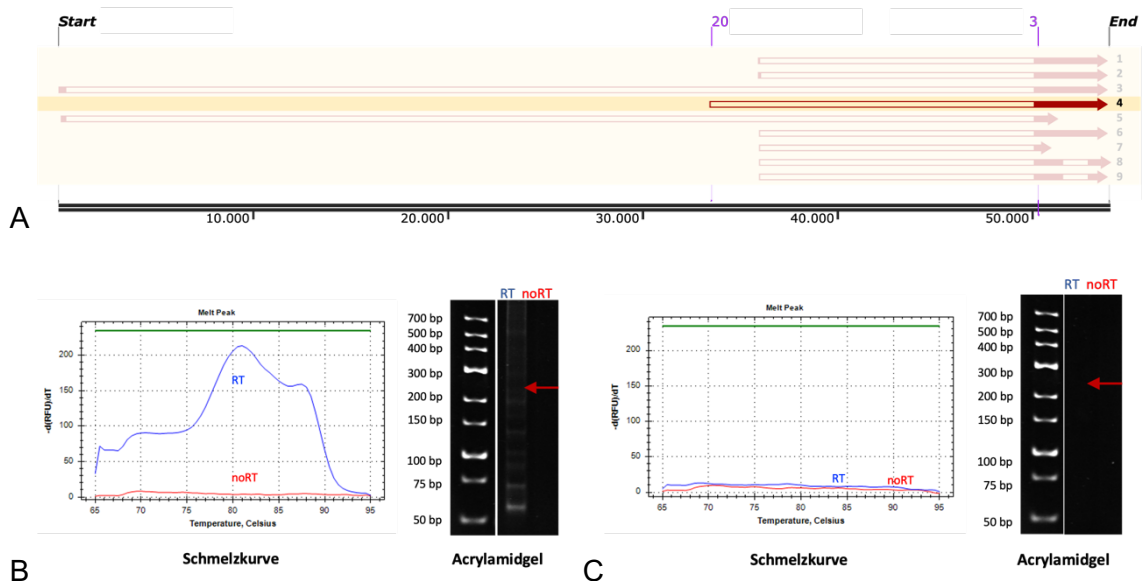


Abbildung 41: Primer Set 14

(A) Lokalisation der Primer 20 und 3 des Primer Sets 14, das spezifisch die Variante 4 amplifizieren sollte. Die Schmelzkurven der RT-qPCR Produkte sowie die Acrylamidgele sind für die qPCR nach reverser Transkription mit Gen-spezifischem Primer (B) und Random Primer (C) gezeigt. Das erwartete Produkt von 244 bp Länge wurde nicht amplifiziert.

Fazit: In der Zusammenschau sprechen die gezeigten Ergebnisse der RT-qPCRs und Acrylamid-Gelelektrophoresen für die Expression der GPR55 mRNA Spleißvarianten 1 (NM_005683.4; ENST00000650999.1) und 3 (XM_011512175.4) in Huh-7 Zellen. Dabei ist der spezifische Nachweis der Variante 3 eindeutig gesichert, während der Nachweis der Variante 1 in Kombination verschiedener Ergebnisse "nur" als weitgehend gesichert gelten kann.

Die Spleißvariante 1 wurde im konservierten Bereich, den sie mit anderen Spleißvarianten gemeinsam hat, mit den Primer Sets 5, 6, 7, 8 sowie durch das indirekt spezifische Primer Set 10 nachgewiesen. Dabei kann man durch die Kombination verschiedener Ergebnisse, den Ausschluss der Varianten 8 und 9 mit den spezifischen Primer-Sets 9 und 11 und den Informationen über den "Transcript Support Level" die

Expression der anderen möglichen Spleißvarianten weitestgehend ausschließen. Diese Identifikation von Spleißvariante 1 bestätigt ihre Annotation als „MANE“ Variante, deren Sequenz in der Literatur am häufigsten verwendet wird und die somit bereits in ihrer Existenz bestätigt wurde.

Spezifisch wurde nur die Spleißvariante 3 mit den Primer Sets 3 und 4 nachgewiesen, wobei Primer Set 4 deutlich bessere Ergebnisse zeigte. Interessant ist, dass Spleißvariante 3 nur in der NCBI-Datenbank zu finden ist und deren Exon 1 (427 bp) am 5'-Ende die 135 bp enthält, in denen sich die GPR55 Gensequenzen in NCBI und Ensembl EBI an diesem Ende unterscheiden. Der verwendete Forward Primer ist in den Nukleotiden 4-26 der Sequenz lokalisiert und liegt somit innerhalb dieser 135 bp am 5'-Ende. Die Identifikation dieser Spleißvariante spricht somit für die GPR55 Genannotation in NCBI und gegen die in Ensembl EBI.

Für die Primer Sets 4, 5, 6, 7, 8 und 10, die spezifische Amplifikation ohne Hintergrundbanden zeigten, wurde im nächsten Schritt die Effizienz in der RT-qPCR mittels Standardkurven ermittelt, um die effizientesten Primer Sets für die Folgeexperimente zur Interaktion von GPR55 mRNA mit dem Hepatitis-C-Virus auszuwählen.

4.2.5 Effizienzbestimmung der Primer Sets mithilfe von Standardkurven

In den vorherigen Experimenten wurde mit spezifischen Primer Sets, die unterschiedliche Sequenzen der GPR55 mRNA Spleißvarianten amplifizierten, nachgewiesen, dass in Huh-7 Zellen die GPR55 mRNA Spleißvarianten 1 und 3 exprimiert waren. Für die Folgeexperimente zur Analyse der möglichen Beeinflussung dieser Expression durch Transfektion von HCV-RNA sollten nun die effizientesten Primer Sets ausgewählt werden. Primer Set 4 war spezifisch für die Spleißvariante 3, die Primer Sets 5, 6, 7 und 8 waren im konservierten Teil aller mRNA Spleißvarianten lokalisiert und Primer Set 10 war indirekt spezifisch für Variante 1.

Durch Standardkurven mit 10-fachen cDNA-Verdünnungsreihen sollte nun die Effizienz (E) dieser Primer bestimmt werden. Dabei wird durch logarithmische Auftragung der Ct-Werte eine Regressionsgerade erstellt, aus der nach Erhebung der Steigung die Effizienz der Primer berechnet wird (s. 3.2.2.14).

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{Steigung}}\right)} - 1$$

Gleichung 1: Formel zur Berechnung der Primer Effizienz in einer qPCR. Mithilfe der Steigung der Regressionsgeraden nach Logarithmieren der Ct-Werte aus einer 10-fachen Verdünnungsreihe kann die Effizienz der Primer berechnet werden.

Idealerweise verdoppelt sich die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus, was einer Effizienz von 1 bzw. 100 % des Primer Sets entspricht. Im Allgemeinen werden für die qPCR Primer-Effizienzen Werte zwischen 90 und 110 % angestrebt (Bio-Rad Laboratories, 2006; Bradburn, 2021; Čepin, 2017).

Berechnete Primer-Effizienzen von unter 100 % können auftreten durch ein mangelhaftes Primerdesign, nicht optimale Reaktionsbedingungen sowie die Bildung von Haarnadelstrukturen oder Sekundärstrukturen in den Primern. Dies führt durch erschwerte Amplifikation der Produkte zu einem verspäteten Überschreiten des Ct-Wertes und somit einer Erhöhung der delta-Ct-Werte der 10-fachen Verdünnungsschritte (Čepin, 2017). Folglich ergibt sich eine steilere Regressionsgerade und somit ein niedrigerer berechneter Wirkungsgrad. Wird für die Effizienz ein Wert größer als 100 % berechnet, deutet dies auf eine Amplifikation von zusätzlichen unspezifischen Produkten oder die Bildung von Primer-Dimeren hin (Čepin, 2017). Außerdem können Verunreinigungen oder Inhibitoren der Polymerase in der cDNA zu artifiziell hohen Effizienzen führen. Infolgedessen ist der Abstand der Ct-Werte zwischen den 10-fachen Verdünnungsschritten geringer als erwartet, da es durch die Inhibitoren trotz Zugabe von mehr Template nicht zu einer verstärkten Amplifikation bei hohen cDNA-Konzentrationen kommt. Durch die höheren delta-Ct-Werte ergibt sich bei Auftragung auf eine logarithmische Skala eine verflachte Regressionsgerade, was zu einer falsch hoch berechneten Effizienz führt. Durch höhere Verdünnung der cDNA werden auch die reaktionshemmenden Verunreinigungen zunehmend verdünnt, weswegen sich die delta-Ct-Werte der Verdünnungsschritte bei niedrigeren cDNA-Konzentrationen an die zu erwartenden Differenzen annähern. Die Abstände der Amplifikationskurven sind infolgedessen in fortgeschrittenen Zyklen tendenziell größer als bei niedrigerer Zyklusanzahl. Pipettierfehler und inakkurate Verdünnungsreihen können fehlerhafte Effizienzen in beide Richtungen verursachen, weswegen besonders auf genaues Pipettieren mit korrekt kalibrierten Pipetten und nicht zu kleinen Volumina zu achten ist (Čepin, 2017).

Aus den vorangegangenen Experimenten zur Erhebung der Variantenexpression war bereits bekannt, dass die GPR55 mRNA Spleißvarianten sehr gering exprimiert waren, was regelhaft zu hohen Ct-Werten über 30 führte. Somit konnte mit dieser Ausgangsmenge an cDNA-Substrat keine 10-fache Verdünnungsreihe mit verlässlichen Ct-Werten erstellt werden. Es wurde eine Methode benötigt, die die Menge an Ausgangssubstrat so weit erhöhte, dass sich Verdünnungsreihen mit mindestens fünf 10-fachen Verdünnungsschritten zur Herstellung einer Standardkurve anfertigen ließen. Zu diesem Zweck wurde eine Prä-Amplifikation durchgeführt (Pašalić et al., 2021). In einer Endpoint-PCR mit 35 Zyklen wurde die mit Random Primern hergestellte cDNA zunächst

mit den spezifischen Primer Sets durch die Phusion-Polymerase amplifiziert (s. 3.2.2.12). Die Produkte dieser PCR wurden dann auf einem 0,8%igen Agarosegel überprüft und anschließend mit einem PCR-Reinigungskit aufgereinigt. Es wurden 10-fache Verdünnungsreihen dieser PCR-Produkte angefertigt (s. 3.2.2.15), die dann als Ausgangssubstrat für die qPCR dienten. Somit konnten, trotz niedrig exprimierter mRNA, Standardkurven zur Effizienzbestimmung der Primer angefertigt werden.

4.2.5.1 Primer Set 4

Primer Set 4 amplifizierte spezifisch Spleißvariante 3 der GPR55 mRNA (s. 4.2.4.4). Bei einer 10-fachen Verdünnungsreihe der präamplifizierten cDNA ergaben sich folgende Werte (E = Effizienz, R2 = Korrelationskoeffizient):

E = 92,3 % R2 = 0,997 Steigung der Regressionsgeraden = -3,521

Die berechnete Effizienz lag somit im Zielbereich von 90 - 110 % und das Primer Set konnte für Folgeexperimente verwendet werden.

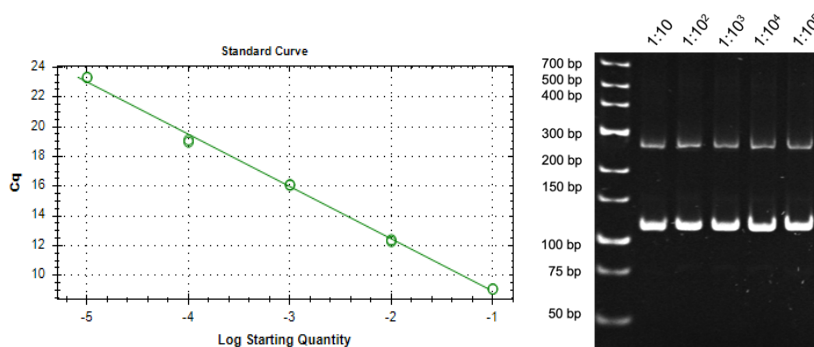


Abbildung 42: Standardkurve für Primer Set 4 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.

Trotz eines unspezifischen Produktes neben dem erwarteten Produkt von 111 bp in der Gelelektrophorese war die berechnete Effizienz mit 92,3 % zufriedenstellend. Primer Set 3 hatte in den Untersuchungen ohne Prä-Amplifikation nie unspezifische Produkte gezeigt und wurde deswegen für die weiteren Analysen der Spleißvariante 3 verwendet.

4.2.5.2 Primer Set 5

Primer Set 5 deckte einen gemeinsamen Bereich aller Spleißvarianten ab und konnte somit für die gemeinsame Bestimmung von Spleißvariante 1 und 3 angewendet werden. Die 10-fache Verdünnungsreihe und Auftragung auf logarithmischer Skala ergab folgende Regressionsgerade mit berechneten Werten:

E = 103,0 % R2 = 0,998 Steigung der Regressionsgeraden = -3,252

Somit lag auch hier die berechnete Effizienz mit 103,0 % im Zielbereich.

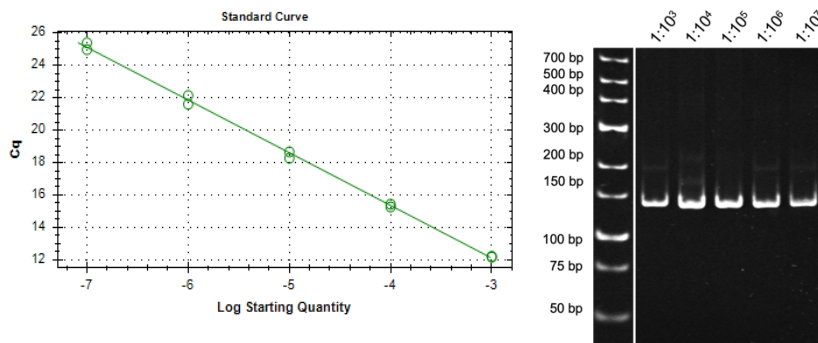


Abbildung 43: Standardkurve für Primer Set 5 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.

Im Agarosegel zeigt sich das erwartete Produkt von 136 bp.

4.2.5.3 Primer Set 6

Primer Set 6 war ebenfalls im gemeinsamen Bereich aller gelisteten Spleißvarianten lokalisiert. Dieses Set war bereits in der Publikation von Pan Hu (Hu et al., 2019) verwendet worden und konnte bei den Vorexperimenten mit nicht prä-amplifizierte cDNA das spezifische Produkt amplifizieren (s. 4.2.4.6). Nach Prä-Amplifikation zeigte sich in der RT-qPCR jedoch bei verschiedenen Anlagerungstemperaturen (60 und 62 °C) die Bildung von Primer Dimeren zusätzlich zum erwarteten Amplikon von 123 bp, was die Effizienzbestimmung mittels Standardkurve beeinflusste. Durch die zusätzlichen Produkte waren die Abstände der Ct-Werte der 10-fachen Verdünnungsschritte kleiner als 3,3, was zu einer Steigung von lediglich -3,065, also einer flacheren Regressionsgeraden, führte. Die berechnete Effizienz lag somit mit 112 % oberhalb des Referenzbereichs von maximal 110 %, weswegen dieses Primer Set für relative Expressionsanalysen nicht verwendet werden sollte.

$E = 112,0 \%$

$R^2 = 0,991$

Steigung der Regressionsgeraden = -3,065

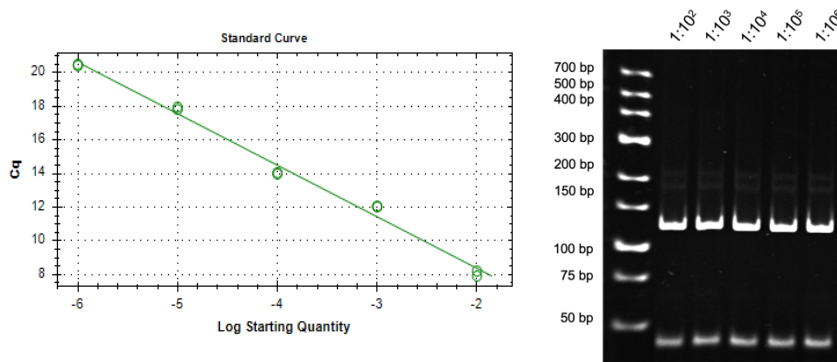


Abbildung 44: Standardkurve für Primer Set 6 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.

Es sind zusätzliche Produkte von kurzer Länge (< 50 bp) im Gel sichtbar, was für die Bildung von Primer-Dimeren spricht. Diese erhöhen artifiziell die berechnete Effizienz der Reaktion.

4.2.5.4 Primer Set 7

Primer Set 7 produziert ein Amplikon von 97 bp im gemeinsamen Bereich aller Spleißvarianten. Auch dieses Set hatte in den vorangegangenen RT-qPCRs gute Ergebnisse bei der spezifischen Amplifikation des erwarteten Produktes gezeigt (s. 4.2.4.7). Nach Prä-Amplifikation der cDNA wurden allerdings in verschiedenen Durchgängen unspezifische Produkte in der qPCR bei der Standardkurvenbestimmung amplifiziert, was die erhobenen Ct-Werte der 10-fachen Verdünnungsreihe verfälschte und somit eine artifiziell hohe Effizienz ergab. Auch dieses Primer Set wurde deswegen nicht zu den weiteren Experimenten zugelassen.

$E = 126,4 \%$

$R^2 = 0,998$

Steigung der Regressionsgeraden = -2,817

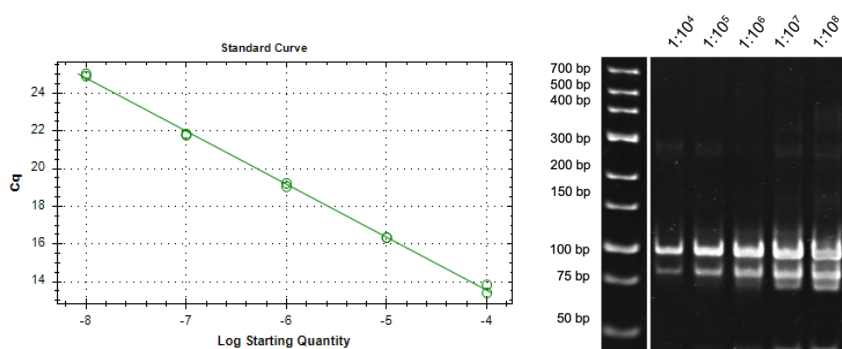


Abbildung 45: Standardkurve für Primer Set 7 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.

Es zeigen sich zusätzlich zu dem erwarteten Produkt von 97 bp Länge unspezifische Produkte.

4.2.5.5 Primer Set 8

Als letztes Primer Set für den konservierten Bereich hatte auch Primer Set 8 zuvor in der RT-qPCR ohne Prä-Amplifikation zuverlässige Ergebnisse bezüglich der spezifischen

Amplifikation des erwarteten Produktes von 87 bp ergeben (s. 4.2.4.8). Nach der Prä-Amplifikation der cDNA trat zunehmend unspezifischer Hintergrund in der RT-qPCR auf, der die Effizienzberechnung verfälschte und zu falsch hohen Effizienzen führte. Daraufhin wurde auch dieses Primer Set aus den Folgeexperimenten ausgeschlossen.

$E = 122,9\%$

$R^2 = 0,989$

Steigung der Regressionsgeraden = $-2,872$

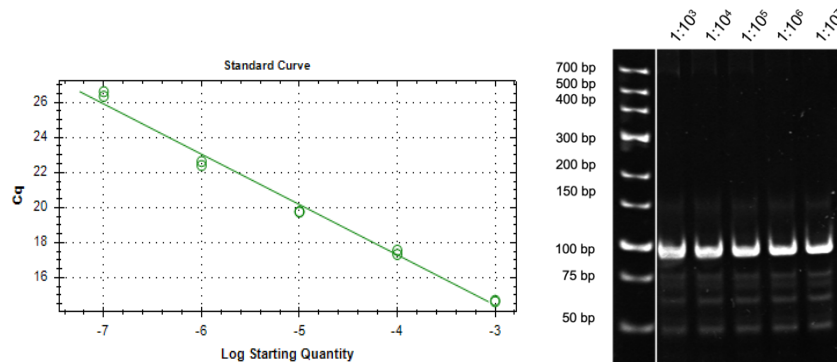


Abbildung 46: Standardkurve für Primer Set 8 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.

Es zeigen sich mehrere unspezifische Produkte < 100 bp, die die berechnete Effizienz verfälschen.

4.2.5.6 Primer Set 10

In der Prä-Amplifikation der cDNA mit der Phusion-Polymerase zeigte sich, dass Primer Set 10 nur bei einer Anlagerungstemperatur von mindestens $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu spezifischen Produkten führte, anders als die anderen Sets, die bereits bei einer Anlagerungstemperatur von $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, wie sie im Protokoll der Phusion-Polymerase empfohlen war, spezifische Produkte produzierten. Somit wurde die Prä-Amplifikation für Primer Set 10 separat durchgeführt. In der anschließenden qPCR wurden die PCR-Produkte dann wiederum in einer 10-fachen Verdünnungsreihe angewendet. Es zeigten sich zusätzlich zum erwarteten Produkt (230 bp) unspezifische Produkte, die den Primer-Dimeren aus der noRT-Kontrolle aus der RT-qPCR ohne Prä-Amplifikation ähneln. Die berechnete Effizienz lag mit $107,9\%$ trotzdem noch im Zielbereich von $90 - 110\%$. Weil Primer Set 10 in den vorherigen Untersuchungen keine Primer Dimere in den RT-Proben gezeigt hatte und kein alternatives Primer Set für die spezifische Untersuchung der Spleißvariante 1 vorlag, wurde dieses Primer Set in den folgenden Experimenten verwendet.

E = 107,9 %

R² = 0,981

Steigung der Regressionsgeraden = -3,145

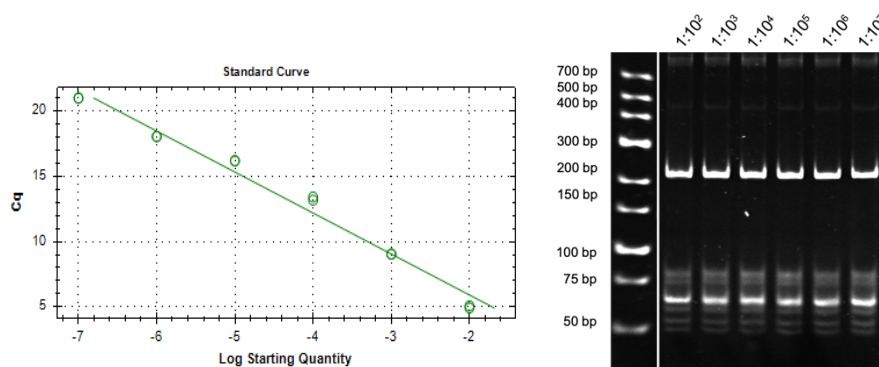


Abbildung 47: Standardkurve für Primer Set 10 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.

Es zeigen sich unspezifische Produkte, die mit Primer-Dimeren zu vereinbaren sind. Da dieses Primer Set in den Untersuchungen ohne Verdünnungsreihen keinen unspezifischen Hintergrund bzw. Primer Dimere gezeigt hatte und das einzig spezifische Set für Spleißvariante 1, die MANE Variante, war, wurde es trotz der Primer Dimere in den hier gezeigten Verdünnungsreihen weiterverwendet.

Fazit: Nach Effizienzanalyse der Primer wurden drei Primer Sets für die weiteren Experimente ausgewählt: Primer Set 4 diente dem spezifischen Nachweis von Spleißvariante 3, Primer Set 10 untersuchte Spleißvariante 1 und Primer Set 5 wurde für die Analyse beider GPR55 mRNA Spleißvarianten verwendet.

4.2.6 Transfektion von full length HCV-RNA in Huh-7 Zellen und Expressionsanalyse der GPR55 mRNA Spleißvarianten

Nachdem die exprimierten Spleißvarianten in Huh-7 Zellen identifiziert wurden und jeweils ein Primer Set spezifisch für Variante 1 und 3 sowie ein Primer Set für die konservierte Region auf Effizienz und Spezifität getestet und ausgewählt wurde, sollte nun untersucht werden, ob und wie stark sich die Expression der Varianten nach der Transfektion von HCV-RNA veränderte. Laut Hu et al. (2019), die primär die gegenseitige Beeinflussung von lnc-ITM2C-1 und HCV-Replikation in Huh-7.5 Zellen untersucht hatten, konnte keine Erhöhung der GPR55-mRNA 6 Tage nach HCV Transfektion detektiert werden, während die lncRNA Expression erhöht war. Interessant war, dass ein Knockdown von lnc-ITM2C-1 mittels Gampers 48 h nach HCV Behandlung zu einer Reduktion der GPR55 mRNA-Expression in Huh-7.5 Zellen geführt hatte. Dies deutete auf eine positive Regulation von GPR55 durch die im Gen benachbarte lnc-ITM2C-1 hin (Hu et al., 2019). Diese Experimente waren an Huh-7.5 Zellen durchgeführt worden, die durch einen Defekt im RIG-I-Signalweg eine verringerte antivirale Immunantwort induzieren und somit empfänglicher für die HCV Replikation sind (Omura

et al., 2019). Huh-7.5 Zellen sind eine Sublinie der Huh-7 Hepatoma Zellen. Huh-7 Zellen hingegen besitzen eine intakte antivirale Immunabwehr und ähneln somit vergleichsweise stärker den gesunden menschlichen Hepatozyten. Weil im Verlauf der Einfluss auf das angeborene Immunsystem und die antivirale Antwort untersucht werden sollte, wurden für die hier beschriebenen Experimente Huh-7 Zellen verwendet, in denen die HCV Replikation allerdings in verringertem Ausmaß stattfindet als in Huh-7.5 Zellen. Nachdem nun auch die exprimierten Spleißvarianten bekannt waren, sollte untersucht werden, ob HCV direkt oder indirekt die Expression einer dieser bestimmten Spleißvariante in Huh-7 Zellen beeinflusst.

4.2.6.1 Transfektion und Western Blot

Dafür wurden Huh-7 Zellen mit HCV-RNA und miRNA-122 transfiziert und 48 h inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die RNA sowie Proteine für den Western Blot extrahiert.

Der Western Blot diente als Bestätigung für die erfolgreiche Translation von HCV in den Zellen, die sich durch einen positiven Nachweis für das HCV Nicht-Strukturprotein NS3 in den transfizierten Zellen zeigte. Als Negativkontrolle dienten Huh-7 Zellen, die nur mit miRNA-122 transfiziert worden waren (Negativkontrolle, engl. „mock“). Der Western Blot diente dabei lediglich als qualitative Kontrolle für die erfolgreiche Translation des NS3 Proteins, jedoch nicht als quantitative Messung, wie viel HCV-Protein in den Zellen translatiert wurde. Beispielhaft ist in Abbildung 48 der Western Blot nach Transfektion Nr. 3 dargestellt. Die restlichen Western Blots der durchgeführten Transfektionen sind im Anhang zu finden (s. Kapitel 12.3). Im Verlauf wurden die Konzentrationen der aufgetragenen Proteine zwischen den einzelnen Durchgängen im Western Blot angepasst, um die Methodik und die Sichtbarkeit der Proteinbanden bei gleichzeitiger Reduzierung des unspezifischen Hintergrunds zu optimieren. Somit bedeuten in diesem Fall stärker oder schwächer ausgeprägte Banden für NS3 nicht zwangsläufig eine höhere oder niedrigere Expression des Proteins im jeweiligen Durchgang des Experiments, sondern u. a. eine angepasste Menge der aufgetragenen Proteinlysate.

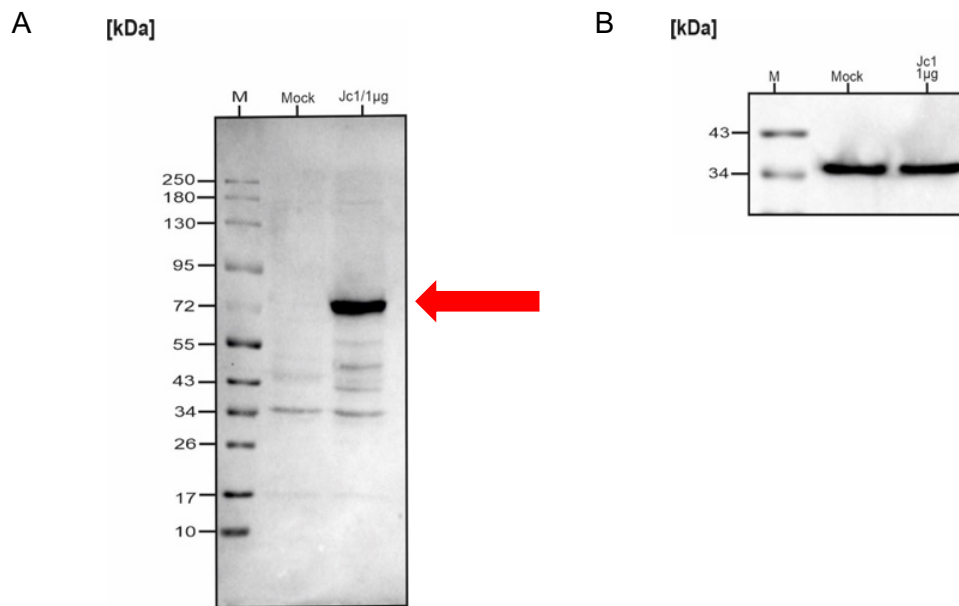


Abbildung 48: Western Blot nach Transfektion Nr. 3 von Huh-7 Zellen mit full length HCV Genom (JC1 Plasmid).

(A) NS3 Protein bei 72 kDa. Nach Transfektion mit JC1 und miRNA122 ist eine Bande mit der Größe des erwarteten Proteins sichtbar (roter Pfeil), die Negativkontrolle (nur miRNA122, mock) zeigt keine Bande für NS3. (B) GAPDH Kontrolle

Fazit:

Die Transfektion der vom HCV Plasmid transkribierten JC1 full length HCV-RNA konnte erfolgreich durchgeführt werden, was durch den Nachweis von NS3 im Western Blot gezeigt wird.

4.2.6.2 Expressionsanalysen der Spleißvarianten mittels RT-qPCR

Um eine Veränderung der Expression zu untersuchen, wurde die extrahierte RNA aus den transfizierten Zellen für eine RT-qPCR verwendet und jeweils die zuvor identifizierten Spleißvarianten 1 und 3 sowie der konservierte Bereich mit spezifischen Primern untersucht und die Expression in den mit HCV transfizierten Zellen (miRNA122 + JC1) mit der Kontrolle (nur miRNA122) verglichen. Insgesamt wurden vier Durchgänge des Prozesses von Transfektion, RNA-Extraktion bis RT-qPCR durchgeführt. Dabei konnte aufgrund der geringen RNA-Ausbeute in den Durchgängen 1 und 2 keine noRT-Kontrolle mit der extrahierten RNA durchgeführt werden. In den Durchgängen 3 und 4 zeigte sich jedoch, wie in den vorherigen Experimenten, dass die noRT-Kontrolle in der qPCR nicht amplifiziert wurde und die RNA während der Extraktion somit sehr gut von residualer DNA befreit wurde.

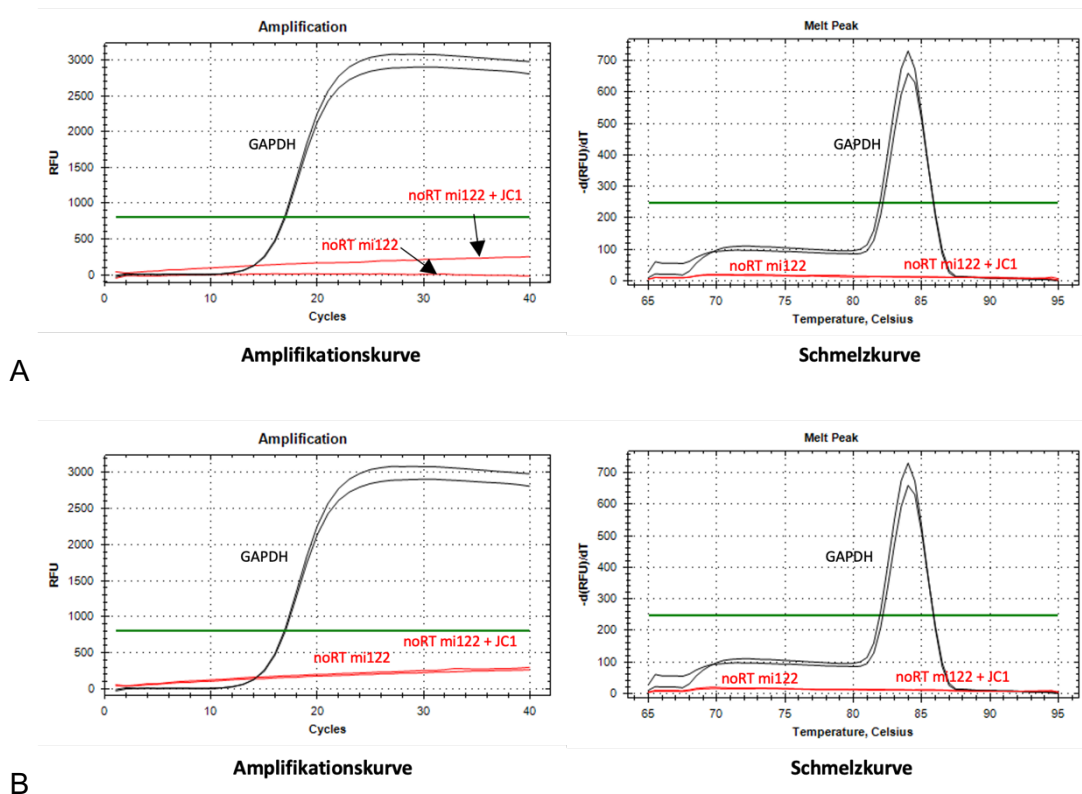


Abbildung 49: Amplifikations- und Schmelzkurven von GAPDH (schwarz) und der noRT-Kontrolle (rot) aus den Transfektionsdurchgängen Nr. 3 (A) und Nr. 4 (B).

Es ist zu sehen, dass die noRT-Kontrollen nicht amplifiziert wurden, was als vollständige Entfernung von residualer DNA aus der RNA nach Transfektion gewertet wurde.

Die Ct-Werte der quantitativen PCR wurden mithilfe der Delta-delta-Ct-Methode auf die Expression der mRNA des Haushaltsgens GAPDH normalisiert und in die relative Veränderung der Expression (relative fold change) umgerechnet. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Relative fold change} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Gleichung 2: Berechnung der relative Expressionsveränderung (relative fold change) aus den delta delta Ct-Werten der qPCR.

Für die statistische Analyse wurden aufgrund der nicht-normalverteilten Ergebnisse sowie der kleinen Stichprobengröße von vier Durchgängen ein Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die p-Werte sind unter den Graphen der untersuchten Spleißvarianten angegeben (Abbildung 50).

Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Expressionen von GPR55 mRNA Spleißvarianten 1 und 3 sowie der Gesamtheit der Varianten in den mit HCV transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (miRNA-122). Jedoch zeigte sich eine leichte

Tendenz zur Erhöhung der Expression in den mit HCV behandelten Zellen, wobei diese Veränderungen u. a. durch die große Streuung der Ergebnisse und die kleine Stichprobengröße nicht signifikant sind. Um einen möglichen signifikanten Effekt aufzudecken, wäre eine höhere Anzahl an Durchgängen des Experiments nötig, die jedoch aus zeitlichen und ökonomischen Gründen sowie einer Fokussierung auf andere Bereiche des Gesamtprojektes nicht durchgeführt wurde.

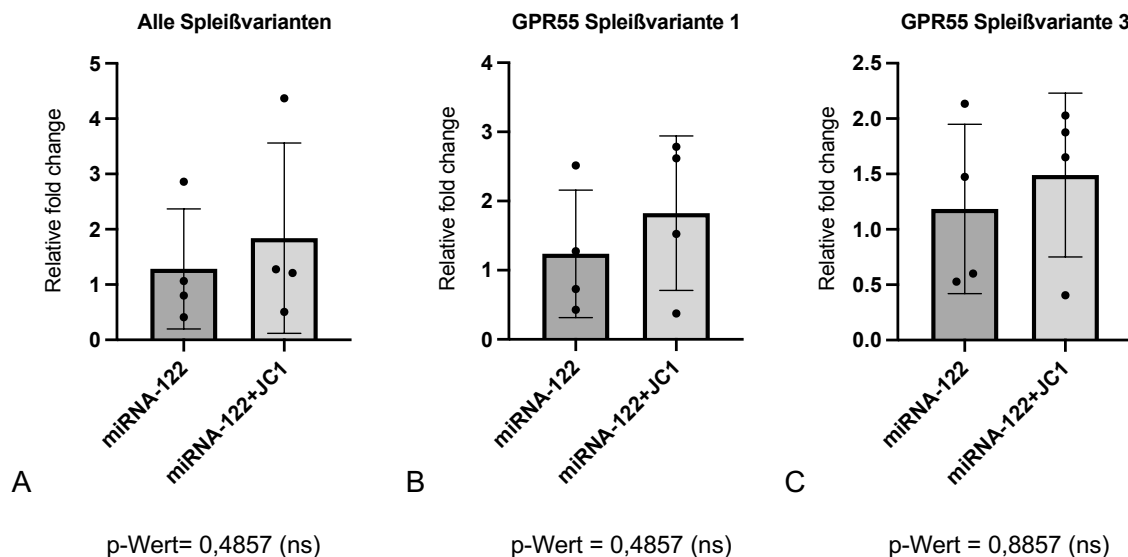


Abbildung 50: Relative Veränderung der Expression (Relative fold change) von GPR55 mRNA Spleißvarianten 48 h nach HCV full length RNA Transfektion in Huh-7 Zellen (miRNA122+JC1) vs. nach Transfektion von lediglich miRNA-122.

(A) Konservierter Teil (mit Primer Set 5 in der RT-qPCR), der alle GPR55 Spleißvarianten betrifft und somit eine allgemeine Abbildung der GPR55 mRNA Expression in den Zellen darstellt. Es zeigt sich keine signifikante Erhöhung der Expression.

(B) Spezifische Untersuchung der Spleißvariante 1 (Primer Set 10), die als MANE Variante gilt. Es zeigt sich auch hier keine signifikante Erhöhung der mRNA Expression nach Transfektion von HCV-RNA.

(C) Spezifische Untersuchung der Spleißvariante 3 (Primer Set 4), die neben Variante 1 klar in Huh-7 Zellen identifiziert wurde. Es zeigt sich keine signifikante Erhöhung der mRNA Expression nach Transfektion von HCV-RNA.

ns = nicht signifikant. miRNA = microRNA

Fazit:

Nach Transfektion mit full length HCV-RNA konnte nach 48 h keine signifikante Veränderung der Expression der GPR55 mRNA, weder für Spleißvariante 1 oder 3 noch für die Gesamtheit aller Spleißvarianten, festgestellt werden. Es zeigte sich eine Tendenz zur Erhöhung der Expression, die jedoch, u. a. aufgrund der großen Streuung der Ergebnisse sowie der kleinen Stichprobengröße, nicht signifikant war.

5 Diskussion

Wie für alle biologischen Prozesse in der Natur ist die Voraussetzung für virale Replikationsprozesse die Interaktion unterschiedlicher Faktoren. Als RNA-Virus ist das Hepatitis-C-Virus abhängig von verschiedenen zellulären Faktoren, zahlreiche Mechanismen sind jedoch noch ungeklärt. Um weitere Fortschritte in der Entwicklung weiterer antiviraler Substanzen und eines wirksamen Impfstoffes zur Prävention einer HCV-Infektion zu erzielen, ist die weitere Entschlüsselung pathogener Mechanismen des Virus unerlässlich.

Vorangegangene Studien verschiedener Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Teile des nicht-proteinkodierenden Genoms, sogenannte non-coding RNAs, einen beträchtlichen Anteil an der zellulären Regulation von Signalwegen haben (Mattick et al., 2023; Quinn und Chang, 2016; Ransohoff et al., 2018). Lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) wurden in den letzten Jahren in diversen (patho)physiologischen Prozessen, u. a. in Interaktionen mit verschiedenen viralen Erregern oder bei der Regulation des Immunsystems, identifiziert (Ouyang et al., 2016; Zhao, 2019).

Die lnc-ITM2C-1 wurde 2019 von Hu et al. als proviraler Wirtsfaktor erkannt (Hu et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass durch eine HCV Replikation in den Zellen diese lncRNA hochreguliert wird und dass umgekehrt durch einen Knockdown der lncRNA mittels Gampers die HCV Replikation und Translation signifikant reduziert wurde. Somit wurde eine gegenseitige positive Regulation der beiden Faktoren postuliert. Weiterhin wurde gezeigt, dass lnc-ITM2C-1 die Expression der mRNA des benachbarten GPR55-Gens positiv beeinflusste und über bisher ungeklärte Mechanismen daraufhin verschiedene ISGs negativ reguliert wurden. Deswegen wurde lnc-ITM2C-1 nach Veröffentlichung der Ergebnisse vom HUGO Gen-Nomenklatur Komitee (HGNC) in „GPR55 cis regulatory suppressor of immune response RNA“ (GCSIR) umbenannt.

Weil lncRNAs häufig über direkte RNA-RNA oder RNA-DNA Interaktionen mit anderen zellulären Nukleinsäuren interagieren, sollten diese nun untersucht werden. Erste *in silico* Experimente hatten mögliche direkte lncRNA-mRNA-Hybridisierungen zwischen lnc-ITM2C-1 und GPR55 gezeigt (Grahn, 2022). Deswegen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die GPR55 mRNA möglicherweise durch eine solche direkte RNA-RNA-Interaktion mit der lnc-ITM2C-1 stabilisiert und somit langsamer abgebaut wird und dass daraus eine erhöhte intrazelluläre Expression von GPR55 resultiert.

Voraussetzung für die weitere Untersuchung einer solchen möglichen direkten lncRNA-mRNA-Interaktion war also die Kenntnis der genauen Sequenzen der jeweiligen beteiligten RNAs. In den gängigen Datenbanken fanden sich sowohl für die lncRNA als

auch für GPR55 mRNA verschiedene Spleißvarianten. Somit war es nötig, zunächst die in Huh-7 Zellen exprimierten Spleißvarianten zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde die GPR55 mRNA untersucht, die Inc-ITM2C-1 wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von M. Khajouei (M.Sc.) analysiert. Für die Untersuchungen sollten RT-qPCRs mit Variantenspezifischen Primer Sets verwendet werden. Um die bekannt niedrig exprimierte mRNA in der RT-qPCR ohne Verfälschung durch residuale DNA nachweisen zu können, war vorher eine Optimierung des RNA-Extraktionsprotokolls notwendig. Im Anschluss sollte der Einfluss der HCV Replikation auf die GPR55 mRNA Expression in Huh-7 Zellen zu einem frühen Zeitpunkt der Replikation untersucht werden.

5.1 RNA-Extraktion

Aufgrund der niedrigen Expression der GPR55 mRNA in Huh-7 Zellen sollte die untersuchte Gesamt-RNA während der Extraktion so weit wie möglich von residualer DNA befreit werden. Eine Verunreinigung hätte in der folgenden RT-qPCR durch Amplifikation von gDNA statt cDNA zu falsch positiven Ergebnissen beim Nachweis der GPR55 Spleißvarianten und der Expressionsanalyse nach HCV Transfektion geführt. Außerdem sollte aufgrund der niedrigen Expression der mRNA eine Degradation so weit wie möglich verhindert werden. Die Gesamt-RNA Extraktion erfolgt in der Regel durch eine der folgenden zwei Methoden: Eine Phenol-Chloroform-Extraktion oder die Verwendung von kommerziell zu erwerbenden Kieselgel-Zentrifugationssäulen (Toni et al., 2018). Darüber hinaus existieren Verfahren mithilfe von „magnetic beads“, die jedoch in dieser Arbeitsgruppe nicht angewendet werden.

Das in der Arbeitsgruppe bis dato etablierte Protokoll zur RNA-Extraktion beinhaltete eine Zellyse durch TRIzol, eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung über Nacht, die zweimalige Aufreinigung mit Ethanol, die anschließende Behandlung mit TURBO™ DNase von Thermo Fisher und eine Wiederholung der Phenol-Chloroform-Extraktion, Fällung und Aufreinigung (s. 4.1.2). Ein häufig im Verlauf der RNA Extraktion gewähltes Verfahren zur Entfernung von DNA ist die Verwendung von DNase, ein Enzym, das doppelsträngige DNA unspezifisch in 5'-phosphorylierte Oligodesoxynukleotide spaltet. Die verwendete TURBO™ DNase war rekombinanten Ursprungs und soll deswegen laut Hersteller im Gegensatz zur Wildtyp-DNase I RNasefrei sein (Thermo Fisher Scientific, 2024a). Im Sommer 2022 zeigte sich erstmals wiederholt nach Gebrauch von TURBO™ DNase eine vollständige Degradation der RNA, weswegen zunächst ein RNase-Inhibitor eingesetzt wurde, der jedoch kostspielig war. Die bestehende gDNA Kontamination der Proben sollte nun mithilfe des RNA-Isolationsprotokoll von Chomzynski und Sacchi reduziert werden, welches sich bereits

1987 die chaotrope Wirkung des Guanidinium-Thiocyanats sowie den sauren pH-Wert bei der Extraktion von reiner RNA zunutze machte (Chomzynski, 1987). Das nun für die regulären RNA-Reinigungen auch außerhalb der Verwendung von TRIzol verwendete Phenol besaß im Vergleich zum vorher verwendeten Phenol einen saureren pH-Wert von 4,5, welches die Anreicherung der DNA in der hydrophoben Phase und somit die Trennung von RNA und DNA verstärken sollte (s. 4.1.2). Hierbei ist zu betonen, dass in diesem Schritt das besonders vorsichtige Abpipettieren des hydrophilen Überstands mit genügend großem Abstand zur „Interphase“ zu einer deutlich verbesserten Aufreinigung der RNA führte, was bereits in anderen Protokollen zur RNA Extraktion betont wurde (Toni et al., 2018).

Trotz der Verwendung des kostspieligen RNase-Inhibitors zeigte sich noch immer eine partielle Degradation der Gesamt-RNA, weswegen ein Protokoll ohne DNase entwickelt wurde. Das ausgewählte Protokoll beinhaltete die Behandlung mit TRIzol, die von 5 auf 20 min verlängert wurde, um die Inaktivierung von RNasen zu maximieren, eine saure Phenol-Chloroform-Extraktion (pH 4,5) und die anschließende Aufreinigung mittels einer Kieselgel-Zentrifugationssäule (NEB Kit, s. Abbildung 15A, Protokoll 7). Durch das Anwenden beider herkömmlicher Methoden zur RNA Extraktion zeigte sich im Vergleich zu zahlreichen alternativen Protokollen die beste Integrität der RNA und eine ausreichende Entfernung residualer gDNA. Das Vorhandensein von gDNA in der Probe wurde durch anschließende RT-qPCR in der noRT Probe (ohne Reverse Transkriptase, hier kann also nur DNA in der PCR amplifiziert werden) und durch Auftragen der PCR-Produkte auf ein Acrylamidgel ausgeschlossen. Ein möglicher Nachteil des neuen Verfahrens war allerdings die durchschnittlich leicht erniedrigte RNA-Konzentration durch das ausführliche Aufreinigen der Proben.

Die RNA Degradation zeigte sich im Verlauf des Sommers 2022 auch unabhängig von der Verwendung von DNase in verschiedenen getesteten Protokollen. Auch durch wiederholten Austausch der verwendeten Reagenzien, den Gebrauch von Einwegmaterial und UV-Licht sowie strenges Arbeiten unter der PCR Clean Bench zeigte sich keine Besserung (New England Biolabs Inc., 2024). Eine klare Ursache der Verunreinigungen mit RNase konnte nicht identifiziert werden. Folglich ergab sich der Verdacht auf eine Verunreinigung des Labors mit RNasen aus externen Quellen. Staub, Hautschuppen, Haare, aber auch bodenlebende Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze, sind die Hauptquellen von kontaminierenden RNasen und kommen natürlicherweise ubiquitär vor (Meridian Bioscience, 2024; Oswald, 2013; Pelley, 2017). Einen Beitrag zum erhöhten Vorkommen von RNasen aus bodenlebenden Mikroorganismen könnte eine gesteigerte Staubverunreinigung in den Laborräumlichkeiten durch den

trockenen Sommer und den benachbarten Hubschrauberlandeplatz der Uniklinik gewesen sein, weil die Luftfilter im Altbau des Labors die auch durch die Hubschrauber stark aufgewirbelte Luft nicht vollständig filtern konnten. Hinweisend darauf ist, dass im Frühling und Herbst bei häufigerem Regen die Luft weniger trocken und staubig war und im Herbst 2022 die RNA-Extraktion wieder erfolgreich mit verschiedenen Protokollen durchgeführt werden konnte. Unter dieser Voraussetzung konnte das oben genannte Protokoll zur bestmöglichen Aufreinigung von residualer DNA bei guter Integrität der RNA entwickelt und in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

5.2 GPR55 und seine Rolle im HCV Replikationszyklus

5.2.1 GPR55 als (Endo)Cannabinoid-Rezeptor und LPI-Rezeptor

Hu et al. zeigten 2019, dass Inc-ITM2C-1 die GPR55 mRNA des benachbarten Gens positiv regulierte und im Verlauf durch eine Suppression antiviraler ISGs die HCV Replikation begünstigt (Hu et al., 2019). Somit wurde geschlossen, dass Inc-ITM2C-1 und GPR55 provirale Wirtsfaktoren für das Hepatitis-C-Virus darstellen. Wie genau die Interaktion zwischen der lncRNA und GPR55 stattfindet, ist nicht eindeutig geklärt, und auch die Wirkung von GPR55 auf die ISGs ist bis dato noch unklar. GPR55 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der ubiquitär exprimiert wird. Seine Rolle in der HCV Infektion, die Wirkung auf die Leberzellen und auf die Immunreaktion sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Hingegen wurden in den vergangenen Jahren Erkenntnisse in der Untersuchung der GPR55 Liganden, Signalwege und der Beeinflussung verschiedener pathologischer Mechanismen gewonnen, die auch bei der HCV Infektion eine Rolle spielen könnten. Der GPR55 Rezeptor bindet sowohl seinen endogenen Liganden Lysophosphatidylinositol (LPI) als auch verschiedene Cannabinoide und Endocannabinoide (Oka et al., 2007, Ryberg et al., 2007). Darüber hinaus bindet der Rezeptor u. a. verschiedene Fettsäureethanolamide und Peptide (Im, 2021). Insgesamt ist bei veröffentlichten GPR55 Expressionsanalysen jedoch zu beachten, dass in unterschiedlichen Quellen teilweise die mRNA Expression und teilweise die Proteinexpression untersucht wurde.

5.2.1.1 Endocannabinoide und ihre Rolle bei Lebererkrankungen

Die Rolle von Cannabinoiden bei Lebererkrankungen hat in den vergangenen Jahren zunehmendes Interesse erweckt. In Patient*innen mit chronischer Hepatitis C konnten erhöhte Plasmakonzentrationen von Endocannabinoiden nachgewiesen werden (Beyoğlu et al., 2023; Patsenker et al., 2015). Gleichzeitig zeigte sich eine Reduktion von LPI im Plasma der Patient*innen. Dies wird neben seiner Rolle als Aktivator von

GPR55 für die Synthese von Phosphatidylinositol-4-Phosphat benötigt, welches wiederum wichtig für die HCV Replikation ist (Beyoğlu et al., 2023). CB₁, ein typischer Cannabinoidrezeptor, der mit GPR55 interagieren kann und ähnliche Liganden bindet, wird durch HCV im Huh-7 Zellmodell hochreguliert (Van Der Poorten et al., 2010). Durch die Behandlung mit dem CB₁ Inhibitor AM251 kann die Produktion von HCV-RNA, viralen Proteinen, neuen Viruspartikeln und die Virusinfektivität reduziert werden (Shahidi et al., 2014). Cannabidiol (CBD) wird als therapeutisches Mittel gegen Leberfibrose, maligne Tumoren und Störungen im Fettmetabolismus untersucht (Chen und Kim, 2024). Es wurde gezeigt, dass CBD die HCV Replikation dosisabhängig inhibiert (Lowe et al., 2017). Am GPR55 Rezeptor ist die Wirkung von CBD umstritten, teilweise wird es als Antagonist angenommen, das „abnormale CBD“, ein Isomer, wird wiederum als Agonist gesehen (Chen und Kim, 2024). Bisher existieren jedoch nur wenige klinische Studien zur Wirkung auf das Hepatitis-C-Virus.

Die genaue Wirkweise der Endocannabinoide auf die HCV Replikation, die chronische Infektion und Folgeerkrankungen der Leber ist noch nicht eindeutig geklärt. Möglich wäre jedoch ein Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus der Wirtszelle, der essenziell für die HCV Replikation ist (s. 1.1.5) und den das HC-Virus für seine Zwecke der Vermehrung und Verbreitung nutzt (Herker und Ott, 2011). Bei einer HCV Infektion verändert sich die Zellmembranzusammensetzung der Wirtszelle, da Cholesterin und Phosphatidylcholin im ER akkumulieren und für die HCV Replikation und die Produktion von Lipovirpartikeln benötigt werden. Gleichzeitig akkumulieren Triglyceride in den Hepatozyten (Beyoğlu et al., 2023; Enjoji, 2011), was langfristig zur Steatosis hepatis und zur Leberfibrose führt. Die Aktivierung des Endocannabinoidsystems (ECS) ist ebenfalls essenziell für die Entwicklung einer Fettleber (Enjoji, 2011). Dabei wurde interessanterweise in Huh-7 Zellen, die stabil HCV Proteine exprimierten, die Akkumulation von Lipiden durch die Behandlung mit CB₁ Agonisten erhöht und durch CB₁ Antagonisten erniedrigt (Enjoji, 2011). Zwar wurde die Wirkung am GPR55 hierbei nicht untersucht, jedoch ist mittlerweile bekannt, dass CB₁ und GPR55 einige Liganden teilen. Bisher ist nicht abschließend geklärt, ob die Entstehung einer Fettleber bei HCV-Infektion durch den Endocannabinoid/Cannabinoid-Rezeptor-Signalweg begründet ist, zu dem auch der GPR55 Rezeptor zählt, es wird jedoch postuliert, dass HCV das Cannabinoidsystem aktiviert (Enjoji, 2011). Es ist wahrscheinlich, dass die Wirkungen hierbei sowohl durch den typischen Cannabinoidrezeptor CB₁ als auch durch GPR55 als „neuen“ Cannabinoidrezeptor vermittelt werden.

Durch seine Beeinflussung des Lipidmetabolismus als Endocannabinoidrezeptor könnte GPR55, neben einer Suppression von antiviralen ISGs, eine weitere provirale Wirkung

besitzen, die das HC-Virus durch eine Aktivierung des ECS selbst anstößt. Dieser Bereich bedarf weiterer Forschung.

5.2.1.2 GPR55 als Immunmodulator

Der Einfluss der GPR55 Expression auf verschiedene Faktoren des Immunsystems wird kontrovers diskutiert. GPR55 Expressionsveränderungen zeigen sich vor allem in Immunzellen selbst, wo sich eine Assoziation zwischen veränderter GPR55 Expression und aktivierten Immunprozessen darstellt (Wnorowski et al., 2021). Bei systemischen inflammatorischen Erkrankungen, die auf einer dysregulierten Immunantwort basieren, wie beispielsweise der Sepsis, wird GPR55 eine proinflammatorische Rolle zugeschrieben (Zhou et al., 2016). Aufgrund der Stimulation von Neutrophilen, Mastzellen, Monozyten und NK-Zellen sowie einer verstärkten Chemotaxis und Produktion proinflammatorischer Zytokine bei GPR55 Aktivierung werden GPR55 Antagonisten als potenzielles therapeutisches Mittel bei Sepsis in Betracht gezogen (Zhou et al., 2016). Sequenzierungsdaten aus Proben des Hepatozellulären Karzinoms (HCC), einer Komplikation der chronischen HCV Infektion, zeigen eine erniedrigte GPR55 mRNA Expression im Vergleich zu normalem Lebergewebe (Wang et al., 2023). Dabei korrelierte die GPR55 Expression im HCC mit der Infiltration von Immunzellen sowie der Expression von Immuncheckpoint-Proteinen. Als wahrscheinlichen Grund dafür nennen die Autor*innen den Umstand, dass GPR55 hauptsächlich von den infiltrierenden Immunzellen im Tumorgewebe exprimiert wird. Eine hohe Konzentration von GPR55 in den Proben implizierte deswegen ein besseres Ansprechen auf eine Immuntherapie bei HCC und korrelierte mit einem verbesserten Gesamtüberleben von Patient*innen mit HCC (Wang et al., 2023). Diese Daten stehen im Kontrast zu Publikationen, die GPR55 eine onkogene und negative prognostische Wirkung bei malignen Erkrankungen zusprachen (Andradas et al., 2011; Falasca und Ferro, 2016; Hasenoehrl et al., 2018; Kitamura et al., 2021).

Die Immunantwort bei einer HCV Infektion wird, wie bereits beschrieben, sowohl durch spezielle Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems als auch durch die Immunantwort der Wirtszelle selbst vermittelt (s. 1.1.6). Die Ergebnisse von Hu et al. liefern Hinweise auf eine Suppression verschiedener antiviraler ISGs durch GPR55 in mit HCV behandelten Hepatoma-Zellen, die genaue Interaktion ist aber noch unklar (Hu et al., 2019). Der Mechanismus der Wirkung von GPR55 auf intrazelluläre pro- und antivirale Signalwege und die Immunantwort von HCV-infizierten Hepatozyten ist bisher unzureichend untersucht und bedarf weiterer Erforschung.

5.2.2 GPR55 mRNA Expressionsanalyse nach HCV Transfektion

Während durch eine HCV Transfektion eine erhöhte Expression der Inc-ITM2C-1 in Huh-7.5 Zellen festgestellt wurde, konnte in früheren Untersuchungen durch Hu et al. 6 Tage nach HCV-RNA Transfektion keine Änderung der GPR55 mRNA Expression festgestellt werden (Hu et al., 2019). Erst nach Suppression der IncRNA mittels spezifischen Gampers sowie HCV Transfektion zeigte sich eine Suppression der GPR55 Expression nach 12, 24 und 48 h. Zu diesem frühen Zeitpunkt war die Expression der HCV-RNA noch unbeeinflusst von der IncRNA Suppression. Dies führte zu der Annahme, dass die IncRNA die benachbarte GPR55 mRNA zu einem frühen Zeitpunkt nach HCV Transfektion reguliert, während diesem Einfluss zu einem späteren Zeitpunkt durch bisher noch unbekannte Faktoren entgegengewirkt wird (Hu et al., 2019).

In den Expressionsanalysen von Hu et al. wurde nicht unter den unterschiedlichen mRNA Spleißvarianten von GPR55 differenziert, das verwendete Primer Set war im gemeinsamen Bereich aller Spleißvarianten lokalisiert. In dieser Arbeit wurde dieses Primer Set (hier genannt Primer Set 6) ebenfalls untersucht und im Verlauf aufgrund unzureichender Effizienz in der Testung mittels Standardkurven zugunsten des Primer Sets 4 für den konservierten Bereich aussortiert (s. 4.2.5.3).

Zudem wurden in dieser Arbeit Huh-7 Zellen statt Huh-7.5 Zellen für die Spleißvariantenanalyse sowie die HCV Transfektion verwendet. Der Grund hierfür war, dass die Inc-ITM2C-1 - GPR55 - ISG Regulationsachse nun in einer Zelllinie mit weitgehend intakter antiviraler Immunantwort untersucht werden sollte. In Huh-7 Zellen ist der RIG-I Signalweg zur Erkennung einer HCV Infektion im Gegensatz zu Huh-7.5 Zellen intakt (Blight et al., 2002). Dies bedeutet im Gegenzug, dass diese Zellen weniger permissiv für eine HCV Transfektion und erfolgreiche Replikation sind, was bei der Durchführung eine Herausforderung darstellte.

Die Expressionsanalyse der GPR55 mRNA Spleißvarianten 1 und 3 sowie aller Varianten gemeinsam zeigten 48 h nach erfolgreicher HCV Transfektion keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und Kontroll-Zellen. Diese Ergebnisse verhalten sich ähnlich wie die Ergebnisse von Hu et al., die ohne eine aktive Suppression der IncRNA mittels Gampers keine Veränderung der GPR55 mRNA 6 Tage nach HCV Transfektion detektieren konnten. Die unterschiedlichen Zellreihen Huh-7.5 und Huh-7 scheinen sich trotz der unterschiedlich agierenden Immunantwort dahingehend also ähnlich zu verhalten. Auch der frühere Zeitpunkt nach HCV Transfektion induzierte ohne eine gleichzeitige Suppression der IncRNA als Mediator keine Veränderung der GPR55 Expression.

Die Entwicklung und Validierung der Varianten-spezifischen Primer sowie die Detektion der exprimierten GPR55 Spleißvarianten 1 und 3 legten den Grundstein für weitere Untersuchungen der Inc-ITM2C-1 - GPR55 - ISG - Regulationsachse. Aktuell werden in der Arbeitsgruppe Experimente zur Überexpression der Inc-ITM2C-1 und der GPR55 mRNA durchgeführt, um die gegenseitige Beeinflussung weiter zu untersuchen.

Auf die methodischen Limitationen der Expressionsanalyse nach Transfektion wird unter 5.3.3 ausführlich eingegangen.

5.3 Technische und methodische Limitationen

5.3.1 Reverse Transkription

Um die GPR55 mRNA Spleißvarianten in einer RT-PCR nachzuweisen, folgte auf die RNA Extraktion die reverse Transkription (RT). In diesem Verfahren wird die mRNA in doppelsträngige cDNA transkribiert, welche im nächsten Schritt in der qPCR als Substrat zur Amplifikation dient. Bei der RT können drei Arten von Primern verwendet werden: OligodT Primer, Random Primer und Gen-spezifische Primer (GSP) (Thermo Fisher Scientific, 2024b). Bei Verwendung von GSP soll nur die gesuchte mRNA-Sequenz in cDNA transkribiert und die Möglichkeit einer unspezifischen Amplifikation in der folgenden qPCR reduziert werden. Hingegen wird bei der Verwendung von Random Primern, die typischerweise als Hexamere vorliegen, die RNA durch Bindung an verschiedenen Lokalisationen in cDNA transkribiert. Zudem werden, im Gegensatz zu OligodT Primern, auch die 5'-Enden von langen Genen transkribiert. Allerdings werden die Gene ggf. nicht in voller Länge am Stück in cDNA umgeschrieben, weil die Hexamere an verschiedenen Stellen auf dem Gen binden und die RT initiieren können. Ein Vorteil von Random Primern besteht darin, dass bei einer zweiseitigen RT-qPCR die gleiche cDNA aus der RT für alle qPCR Ansätze verwendet werden kann, wohingegen bei Verwendung von GSP für jede Spleißvariante eine separate RT durchgeführt werden muss, was insgesamt mehr Zeit, Material und extrahierte RNA benötigt. 1999 hatten Zhang und Byrne gezeigt, dass die Verwendung von längeren (22 bp) sequenz-spezifischen antisense Primern zur Herstellung von cDNA zu einer genaueren Detektion von mRNA-Kopien im Vergleich zu unspezifisch bindenden Hexameren führte (Zhang und Byrne, 1999). Als vermuteten Grund für die akkuratere Detektion der Ziel-mRNA nannten die Autor*innen u. a. die Synthese von trunkierten cDNA-Sequenzen bei der Verwendung von Hexameren, bei denen in der anschließenden RT-qPCR Bindungsstellen für die PCR-Primer fehlten (Zhang und Byrne, 1999). Somit wurden zu Beginn der Experimente dieser Arbeit GSP in der reversen Transkription verwendet, um

im weiteren Verlauf die GPR55 mRNA Spleißvarianten möglichst sensitiv und spezifisch in der RT-qPCR detektieren zu können.

Trotz der theoretisch höheren Sensitivität und Spezifität bei Verwendung von GSP in der RT zeigten sich im Verlauf nach Verwendung von Random Primern durchweg eine sensitivere und spezifischere Detektion der GPR55 Spleißvarianten in der qPCR und in der anschließenden Gelelektrophorese. Die Spleißvariante 3 konnte beispielsweise erst nach Verwendung von Random Primern in der RT nachgewiesen werden, während nach der RT mit GSP keine Amplifikation in der qPCR stattfand (s. Primer Set 3, 4.2.4.3). Umgekehrt zeigte sich anhand der qPCR-Schmelzkurven und der Acrylamidgele vermehrt unspezifische Amplifikation von PCR-Produkten bei Verwendung von cDNA aus GSP-RT. Bei den Primer Sets 1 und 13 zeigte sich sogar die Amplifikation eines einzelnen Produktes einer falschen Größe (Off-Target-Effekt), welche bei der cDNA nach Random Primern nicht auftrat (s. 4.2.4.1, 4.2.4.13).

Diese Ergebnisse sind genau umgekehrt zu den Erwartungen und Publikationen einer sensitiven und spezifischen Detektion mittels Gen-spezifischen Primern in der RT (Zhang und Byrne, 1999). Eine mögliche Erklärung für die unerwarteten Ergebnisse dieser Arbeit wäre die insgesamt höhere Ausbeute an cDNA bei Verwendung von Random Primern bei niedriger angenommener Expression von GPR55 mRNA und aufgrund dessen eine bessere Detektion und höhere Ausbeute an Produkt in der qPCR unter Verwendung von validierten und spezifischen PCR-Primern. Außerdem besitzen Random Primer den Vorteil, dass sie auch an degradierte RNA binden und diese amplifizieren können (Thermo Fisher Scientific, 2024b). Da die Degradation von RNA wie bereits beschrieben zeitweise eine große Herausforderung während der Experimente dieser Arbeit darstellte, könnten bereits die reverse Transkription kleiner Mengen degradiertes GPR55 mRNA zu einer besseren Detektion in der RT-qPCR geführt haben. Trotzdem ist der Grund für die Ergebnisse, die genau entgegen der obigen Erwartung und veröffentlichten Literatur stehen, nicht vollends geklärt. In gängigen Online-Portalen für den Austausch von Wissenschaftlern (z. B. ResearchGate.net) wurde jedoch teilweise ebenfalls zu Random Primern geraten, um eine möglichst große Menge an cDNA in der reversen Transkription zu generieren, die in der nachfolgenden qPCR dann mit möglichst spezifischen Primern zu einer Amplifikation der niedrig exprimierten mRNA führen sollte (Research Gate, 2016). Dabei ist jedoch wichtig zu betonen, dass dies lediglich Erfahrungswerte verschiedener Wissenschaftler aus dem Laboralltag waren und im Rahmen der Recherche keine wissenschaftlichen Publikationen zur Erklärung dieser Problematik gefunden wurden.

5.3.2 RT-qPCR und Varianten-spezifisches Primer Design

Um möglichst spezifische qPCR-Primer zu generieren, wurden verschiedene Kriterien zur Optimierung von eigens entwickelten Oligonukleotiden berücksichtigt, u. a. die Länge der Oligonukleotide, der GC-Gehalt, die Schmelztemperaturen sowie eine mögliche Bildung von Primer-Dimeren oder Haarnadel-Formationen (s. 3.2.6.2). Die Sequenzspezifität der Primer wurde durch eine Analyse mittels der Online-Ressource Nukleotide-BLAST geprüft, welche Sequenzhomologien im gesamten menschlichen Genom analysiert (NCBI, 2022a). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit einiger Spleißvarianten mussten im Verlauf Kompromisse bei der Erfüllung der Kriterien eingegangen werden. Einige Spleißvarianten unterschieden sich nur in wenigen Nukleotiden, weswegen die Primer zur Unterscheidung in begrenzte Bereiche platziert werden mussten, dabei konnten teilweise nicht alle Kriterien vollends erfüllt werden.

Neben der größtmöglichen Entfernung von DNA in der RNA-Extraktion (s. 5.1) kann auch durch die Verwendung von Exon-Exon-Primern die Amplifikation von residualer DNA in der qPCR verhindert werden. Das Vorhandensein der Introns in der DNA verhindert die Bindung von Primern, die eine Exon-Exon-Grenze überspannen (Sandhu und Acharya, 2005). Die gelisteten GPR55 mRNA Spleißvarianten besaßen jedoch jeweils nur 2 - 3 Exons, was die Erstellung solcher Primer erschwerte. Die Exon-Exon-Grenze der Spleißvarianten 1, 6, 7, 8 und 9 war die gleiche, weswegen der Primer 14 beispielsweise an alle dieser Varianten gebunden hätte. Aufgrund des zusätzlichen Introns der Varianten 8 und 9 konnte für diese ein spezifischer Exon-Exon-Primer generiert werden (Primer 16, siehe Primer Set 11, 4.2.4.11). Diese Varianten unterschieden sich jedoch nur in einem Basenpaar, weswegen es nicht möglich war, durch spezifische Primer eine individuelle Detektion zu erreichen. Zudem konnte bei Verwendung von Exon-Exon-Primern das Primer Set nicht an genomischer DNA validiert werden, was für alle anderen Primer Sets vor der Anwendung in der RT-qPCR erfolgte (s. 4.2.2). Somit konnten vor Verwendung in der RT-qPCR die Primer Sets mit Exon-Exon Primern nicht auf Spezifität getestet werden.

Bei den Varianten 2, 3 und 4, deren Exon 1 sich von den anderen Varianten unterschied, war es aufgrund des kleinen Sequenzbereichs und der dadurch bedingten geringen Möglichkeit zur Anpassung anhand der Qualitätskriterien nicht möglich, einen spezifischen Exon-Exon-Primer zu erstellen. Außerdem beinhaltete der Beginn des zweiten Exons die gleiche Nukleotidsequenz wie bei allen anderen Varianten, was eine unspezifische Bindung an die anderen Varianten begünstigt hätte. Alternativ wurde bei diesen Varianten der Forward Primer jeweils vollständig im ersten Exon platziert (Primer 2, 4, 5, 19, 20) und als Intron-spanning Primer Set mit einem Reverse Primer im zweiten

Exon kombiniert (Primer 3). Durch diese Anordnung wäre ebenfalls in der PCR mögliche residuale DNA nicht vollständig amplifiziert worden, da das Amplikon zu lang für den gewählten Elongationszeitraum gewesen wäre. Deswegen wurden für die Validierung an gDNA separate Helping Primer verwendet, die im Intron lokalisiert waren (Primer 5, 6, 29, 30, 31, 33, 34). So konnte durch das Auftragen der PCR-Produkte auf dem Acrylamidgel das Vorhandensein unspezifischer Produkte untersucht werden, die jedoch nicht die endgültige Primer-Kombination, sondern lediglich den Forward Primer prüften (s. 12.2).

Ein unerwünschter Effekt in der qPCR ist die Bildung von Primer Dimeren, die durch eine Hybridisierung des Forward und Reverse Primers, vor allem am 3'-Ende, entstehen (Merck, 2024). Diese Primer Dimere lenken die Reaktionskomponenten von der Synthese des gewünschten Produkts ab und verringern so die Effizienz und Empfindlichkeit des Assays. Bei SYBR-Green-Farbstoff basierten qPCR-Assays, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, lagert sich der Farbstoff in den doppelsträngigen Primer Dimeren an und führt so zu einer falsch hohen Detektion der Produkte. In der Schmelzkurve sind solche Primer Dimere als Kurve mit einem Peak im unteren Temperaturbereich, verglichen mit den erwünschten, längeren Produkten sichtbar, da die Dimere bereits bei niedrigeren Temperaturen dissoziieren.

Bei Primer Set 10 war in der noRT-Kontrolle eine Schmelzkurve mit einem Peak bei ca. 79 °C sichtbar, während die des gewünschten Produktes ihre Spitze bei 84 °C hatte. Im dazugehörigen Gel zeigten sich in der noRT-Kontrolle unspezifische Produkte mit einer Länge von ca. 60 - 70 bp, die wahrscheinlich auf die Bildung von Primer-Dimeren zurückzuführen sind. Weil in der RT-Probe jedoch keine Primer-Dimere in der Schmelzkurve und im Gel nachgewiesen werden konnten, wurde daraus geschlossen, dass bei Vorhandensein von cDNA als Substrat in der qPCR sich die Primer spezifisch an diese anlagerten und keine Primer-Dimere entstanden (s. 4.2.4.10). Da dieses Primer Set als einziges zur spezifischen Detektion von Variante 1 (MANE) funktionierte und in der Effizienzbestimmung mittels Standardkurven zufriedenstellende Ergebnisse zeigte, wurde es in den weiteren Analysen verwendet. Es kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass es bei diesem Primer Set zur Bildung von Primer Dimeren kommt, die die qPCR Reaktion beeinflussen könnten.

5.3.3 Expressionsanalyse nach HCV Transfektion

Pan Hu hatte in ihren Untersuchungen gezeigt, dass durch eine Suppression von Inc-ITM2C-1 eine Downregulation von GPR55 nach 12, 24 und 48 h in HCV transfizierten Huh-7.5 Zellen stattfand. Diese hielt wahrscheinlich nicht lange an, da sich trotz einer

erhöhten lncRNA Expression 6 Tage nach HCV Replikation keine Änderung der GPR55 Expression zeigte. Dies führte zu der Annahme, dass lnc-ITM2C-1 die *cis*-Regulation von GPR55 nur innerhalb einer kurzen Zeitperiode nach Beginn der HCV Replikation ausübte (Hu et al., 2019). Deswegen sollte die GPR55 Expression früh (48 h) nach HCV Transfektion in Huh-7 Zellen untersucht werden.

Um eine Änderung der GPR55 mRNA Expression durch die HCV Replikation zu detektieren, wurden mittels RT-qPCR und der $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ -Methode die Menge der GPR55 mRNA in Huh-7 Zellen nach HCV Transfektion und erfolgreicher Replikation mit einer Kontrolle verglichen (Livak und Schmittgen, 2001).

Die niedrige Expression von GPR55 mRNA in Huh-7 Zellen mit durchschnittlichen Ct-Werten von > 32 in allen Proben führte zu einer großen Streuung bzw. Standardabweichung und unzuverlässigen Ergebnissen. Auch eine von Experiment zu Experiment unterschiedliche Anzahl an Zellen, die HCV RNA erfolgreich aufgenommen und repliziert haben, kann zur großen Streuung beitragen, ebenso wie die Qualität der extrahierten RNA, welche sehr empfindlich gegenüber schon geringsten Mengen an kontaminierenden RNasen ist. Eine Möglichkeit, das methodische Problem der niedrigen GPR55 Expression zu beeinflussen, wäre die Überexpression von GPR55 durch Plasmide, die zurzeit in der Arbeitsgruppe etabliert wird. Aus ökonomischen Gründen wird dabei jedoch nur die Spleißvariante 1, die in den Datenbanken als MANE Variante bezeichnete Sequenz, verwendet.

Zudem konnte aus zeitlichen Gründen nach anfänglichen methodischen Herausforderungen bei der HCV Transfektion von Huh-7 Zellen lediglich eine Stichprobengröße von 4 Durchgängen in diese Arbeit eingeschlossen werden, was die Teststärke und die Statistik deutlich einschränkt. Um verlässlichere Ergebnisse zu generieren, wären somit mehr Durchgänge nötig. Dies wurde aufgrund der methodischen Herausforderungen aus ökonomischen und zeitlichen Gründen nicht durchgeführt und sich auf andere Schwerpunkte im Projekt, insbesondere die Überexpression der GPR55 mRNA mittels Plasmiden durch M. Khajouei, konzentriert.

5.3.4 Annotationen von mRNA Spleißvarianten in Datenbanken

Um mögliche direkte RNA-RNA Interaktionen zwischen lnc-ITM2C-1 und der GPR55 mRNA weiter zu untersuchen, war es nötig, die jeweilige exakte RNA-Sequenz zu kennen. In den Datenbanken Lncipedia, NCBI und Ensembl fanden sich für die lncRNA insgesamt 13 (s. separate Arbeit von M. Khajouei, M.Sc.) und für die GPR55 mRNA 9 Spleißvarianten. Diese wurden größtenteils durch bioinformatische Algorithmen vorhergesagt, einzig bei der MANE Variante der GPR55 mRNA ist eine Bestätigung

durch diverse Publikationen beschrieben (NCBI, 2024). Bei den Alignments der GPR55 Spleißvarianten an die Gensequenz fiel auf, dass sich die GPR55 Gensequenzen in NCBI (Gene ID 9290) und Ensembl (ENSG00000135898) unterschieden. Somit konnten die mRNA Spleißvarianten erst nach der Erstellung eines Gens mit den zusammengeführten Grenzen aus den beiden Datenbanken alle in ein gemeinsames Alignment aufgenommen werden. Es stellt sich die Frage, inwiefern auf die Richtigkeit der aufgeführten Spleißvarianten und der annotierten Gene vertraut werden kann. In den durchgeführten Analysen konnten die Spleißvariante 1 und 3 direkt und indirekt durch RT-qPCR mit spezifischen Primern nachgewiesen werden. Weil die Spleißvariante 3 in dem Bereich des GPR55 Gens lokalisiert ist, der lediglich in NCBI annotiert ist, spricht dies für die Richtigkeit der NCBI Annotation. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sollte also eine Anpassung der Ensembl Datenbank vorgenommen werden.

5.3.4.1 Neue Annotationen von GPR55 Spleißvarianten

Darüber hinaus werden stetig neue annotierte Transkripte in den Datenbanken hinzugefügt oder bestehende Transkripte aktualisiert. Bereits zwischen dem Beginn der diesbezüglichen Untersuchungen von N. Grahn im Oktober 2021 und dem Beginn dieser Arbeit im März 2022 waren die Sequenzen GPR55 Spleißvarianten in NCBI aktualisiert worden, weswegen die Alignments neu angefertigt werden mussten. Eine weitere Aktualisierung von NCBI erfolgte im Februar 2023, wobei 3 neue Transkripte (XM_054344567.1, XM_054344568.1, XM_054344569.1) gelistet wurden, die somit nicht in die experimentellen Expressionsanalysen im Rahmen dieser Dissertation, die bis November 2022 erfolgten, miteinbezogen werden konnten (NCBI, 2022c).

Tabelle 3: Neue Annotationen der GPR55 mRNA Spleißvarianten in NCBI, die erstmals im Februar 2023 gelistet wurden. Die Benennungen in Spalte 1 sind, analog zu den bereits behandelten Spleißvarianten, selbst erfolgt, die volle Transcript ID aus NCBI ist in Spalte 4 gezeigt. Die cDNA Sequenzen werden im Anhang 12.1 gezeigt.

Spleißvariante	Länge	Quelle	Transcript ID	Exons
New X1	4125	NCBI	XM_054344567.1	2
New X2	4379	NCBI	XM_054344568.1	2
New X3	3846	NCBI	XM_054344569.1	2

Bei genauerem Betrachten des nachträglichen Alignments dieser neu annotierten GPR55 Spleißvarianten fällt auf, dass die neuen Varianten jeweils bereits zuvor vorhandenen Varianten ähneln. Einzelne Basenpaare in der konservierten Region aller GPR55 Varianten unterscheiden sich, was im Alignment mit allen Spleißvarianten am GPR55 Gen an kurzen Unterbrechungen in der konservierten Region im 3'-Bereich (s.

Abbildung 51, rechts im Bild) sichtbar wird. Insgesamt wurden dort in den neuen Varianten 6 Basenpaare ausgetauscht und ein zusätzliches Basenpaar eingefügt.

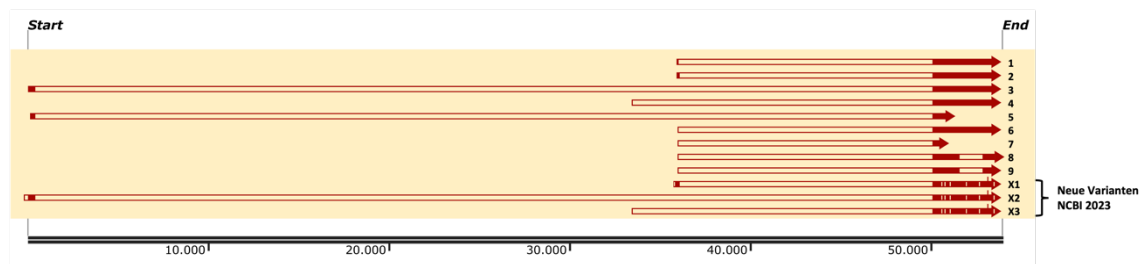


Abbildung 51: Alignment mit den neu annotierten Spleißvarianten X1, X2, X3 auf NCBI.

Vergleicht man einzelne Spleißvarianten, besteht eine Ähnlichkeit zwischen Spleißvariante 1 und der neuen Variante X1. Letztere hat ebenfalls 2 Exons, das erste Exon beinhaltet die Sequenz des Exon 1 der Spleißvariante 1, ist jedoch insgesamt 280 bp länger. Dabei ergibt sich auch eine veränderte Spleißstelle zwischen den Exons.

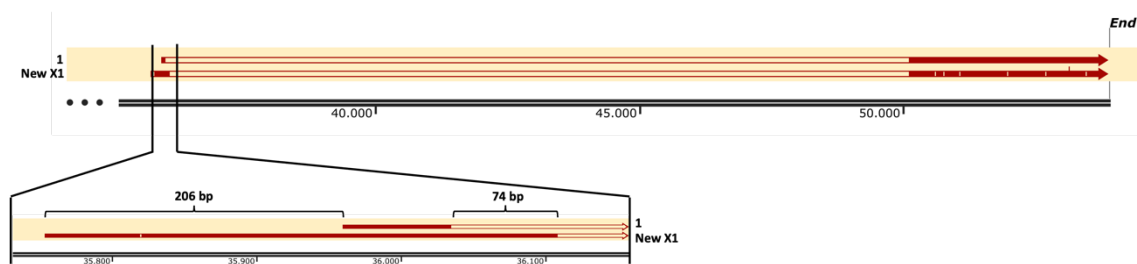


Abbildung 52: Alignment der Spleißvariante 1 (MANE) und der neu annotierten Variante X1.

Es ist sichtbar, dass Exon 1 der neuen Variante insgesamt 280 bp länger ist und sich die Spleißstelle verschiebt.

Zudem besteht eine Ähnlichkeit zwischen Spleißvariante 3 und der neuen Variante X2. Dabei fällt auf, dass die Spleißstelle gleichbleibt, das Exon 1 der neuen Variante jedoch im 5'-Bereich 182 bp länger ist. Interessant ist dies, weil durch die Untersuchungen in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Variante 3 in Huh-7 Zellen nachgewiesen werden konnte und somit die längere GPR55 Genannotation in der NCBI-Datenbank der im 3'-Bereich kürzeren Annotation aus Ensembl vorzuziehen ist. Dadurch, dass NCBI nun eine weiter verlängerte Spleißvariante X2 annotiert hat, besteht die Möglichkeit, dass die Genannotation ebenfalls noch geändert wird. Bisher (Stand Januar 2025) wurde die Genannotation auf NCBI allerdings nicht verändert, die annotierte Spleißvariante befindet sich demnach bis dato nicht im Bereich des auf NCBI annotierten GPR55-Gens.

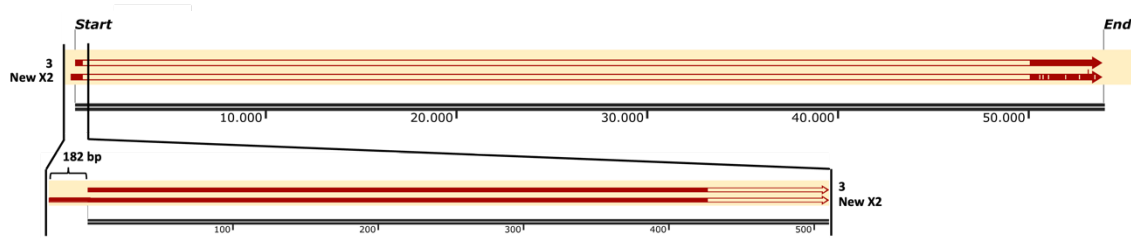


Abbildung 53: Alignment der Spleißvariante 3 und der neu annotierten Variante X2 an der GPR55 Hybrid-Gensequenz.

Variante X2 ist im 5'-Bereich 182 bp länger als die in Huh-7 Zellen nachgewiesene Spleißvariante 3 und befindet sich nicht mehr im Bereich des annotierten Gens in NCBI.

Die neue Variante X3 und die Spleißvariante 4 unterscheiden sich durch eine Verlängerung des Exon 1 um 2 bp im 5'-Bereich sowie in den einzelnen Austausch von Basenpaaren im konservierten Bereich aller Spleißvarianten (s. o.):

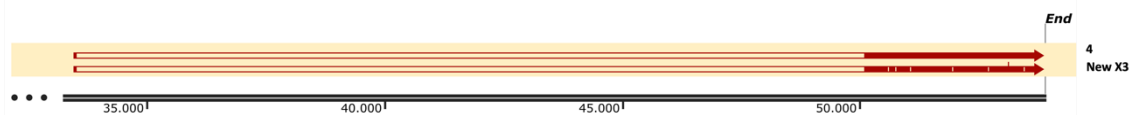


Abbildung 54: Alignment der Spleißvariante 4 (3843 bp) und der neu annotierten Variante X3 (3846 bp).

Außer dem bereits beschriebenen Austausch von Basenpaaren an 6 Stellen und dem Hinzufügen eines Basenpaars zeigt sich eine Verlängerung von Exon 1 um 2 bp in der neuen Variante. Die Spleißstellen beider Varianten sind gleich.

Die neuen Annotationen von mRNA Spleißvarianten könnten die in dieser Arbeit identifizierten Spleißvarianten 1 und 3 in Huh-7 Zellen stützen, da die neu annotierten Varianten X1 und X2 diesen von der Verteilung der Exons und der Sequenz stark ähneln.

Durch den in dieser Arbeit erfolgten Nachweis der Spleißvariante 3 in Huh-7 Zellen wird die GPR55 Genannotation aus NCBI bestätigt. Die abweichende Annotation in Ensembl EBI sollte somit angeglichen werden, um die Grenzen des GPR55 Gens in beiden Datenbanken korrekt anzugeben. Zudem sollten die annotierten Transkripte beider Datenbanken kritisch geprüft und ggf. zusammengeführt werden. Die Spleißvarianten 1 (NM_005683.4; ENST00000650999.1) und 3 (XM_011512175.4) können aus der hier vorliegenden experimentellen Arbeit heraus als bestätigt angesehen werden und sollten dementsprechend in den Datenbanken gekennzeichnet werden.

6 Zusammenfassung

Das Hepatitis-C-Virus ist ein hepatotropes, einzelsträngiges RNA-Virus aus der Gruppe der Flaviviridae. Weltweit leiden über 50 Millionen Menschen an einer HCV Infektion. Diese führt besonders durch eine Chronifizierung und Folgeerkrankungen wie Leberzirrhose und Hepatozelluläres Karzinom trotz mittlerweile etablierter, aber noch immer kostspieliger Therapie zu einer hohen Morbidität und Mortalität.

HCV ist während seines Replikationszyklus auf Strukturen und Signalwege der Wirtszelle angewiesen. Die zugrundeliegenden Interaktionen sind noch immer nicht vollends erforscht. Um die von Hu et al. 2019 identifizierte proviral wirkende Inc-ITM2C-1 - GPR55 - ISG Regulationsachse weiter zu untersuchen, wurde sich in dieser Arbeit mit der Expressionsanalyse von GPR55 mRNA Spleißvarianten im Kontext der HCV Replikation befasst.

Zur Identifikation der in nativen Huh-7 Zellen exprimierten GPR55 mRNA Spleißvarianten mittels RT-qPCR wurde zunächst das Protokoll zur Gesamt-RNA-Extraktion überarbeitet, mit dem Ziel einer Verhinderung der RNA-Degradation und Reduktion kontaminierender gDNA. Das entwickelte Protokoll umfasste eine verlängerte Behandlung mit TRIzol, eine saure (pH 4,5) Phenol-Chloroform-Extraktion und die Aufreinigung mittels Kieselgel-Zentrifugationssäule. Die Entfernung von gDNA wurde mittels einer noRT-Kontrolle in der RT-qPCR und Gelelektrophorese bestätigt. Das neue Protokoll wurde erfolgreich in der Arbeitsgruppe etabliert.

Die Untersuchung der 9 verschiedenen in den Datenbanken NCBI und Ensembl EBI gelisteten GPR55 mRNA Spleißvarianten erfolgte zunächst mittels bioinformatischer Alignments der einzelnen cDNA-Sequenzen an der GPR55 Gensequenz. Letztere wurde manuell aus den leicht abweichenden Annotationen aus NCBI und Ensembl als Hybridsequenz zusammengesetzt. Anhand der Alignments und der Exongrenzen wurden möglichst Varianten-spezifische qPCR-Primer erstellt und validiert. Mittels RT-qPCR und Gelelektrophorese wurde anschließend die Expression der Spleißvarianten 1 (NM_005683.4; ENST00000650999.1) und 3 (XM_011512175.4) in Huh-7 Zellen identifiziert.

Die Expression der Spleißvariante 1 und 3 sowie die Expression aller GPR55 mRNA Spleißvarianten insgesamt wurden anschließend in HCV-transfizierten Huh-7 Zellen mit der Expression in Kontrollzellen verglichen. Es zeigte sich keine signifikante Änderung der GPR55 mRNA Expression 48 h nach HCV Transfektion, weder für die einzelnen Varianten 1 und 3 noch für die Gesamtheit aller GPR55 Spleißvarianten.

Die erstellten und validierten GPR55 Primer für die damit identifizierten Spleißvarianten in Huh-7 Zellen sind der Grundstein für weitere Analysen der Inc-ITM2C-1 - GPR55 - ISG -Regulationsachse in der Arbeitsgruppe. Sie werden aktuell für Untersuchungen mit GPR55 mRNA Überexpression durch Plasmide verwendet.

Durch den Nachweis der Spleißvariante 3 wurde die GPR55 Genannotation aus NCBI bestätigt. Die abweichende Annotation aus Ensembl EBI wurde bis dato (Januar 2025) nicht angepasst. Nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit sollten die gelisteten GPR55 Transkripte in den Datenbanken NCBI und Ensembl EBI kritisch überarbeitet und ggf. zusammengefasst werden. Auch die Sequenzgrenzen der Genannotation in Ensembl EBI sollte entsprechend der Annotation in NCBI angepasst werden.

7 Conclusion

The hepatitis C virus (HCV) is a hepatotropic, single-stranded RNA virus belonging to the Flaviviridae family. Globally, more than 50 million individuals are affected by an HCV infection, which results in significant morbidity and mortality, mainly due to chronic HCV infections. Those lead to complications such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, despite the availability of established yet costly HCV treatments.

HCV replication relies on various host cell structures and signaling pathways though the detailed mechanisms underlying these interactions remain incompletely understood. In this context, the thesis aimed to further explore the proviral Inc-ITM2C-1 - GPR55 - ISG regulatory axis identified by Hu et al. (2019) by focusing on the expression analysis of different GPR55 mRNA splice variants during HCV replication.

To identify GPR55 mRNA splice variants expressed in native Huh-7 cells by RT-qPCR the protocol for total RNA extraction was first revised with the aim of preventing RNA degradation and reducing contaminating gDNA. The protocol developed included prolonged treatment with TRIzol, acidic (pH 4.5) phenol-chloroform extraction and purification using a silica gel centrifugation column. The removal of gDNA was confirmed using a noRT control in RT-qPCR and gel electrophoresis. The new protocol was successfully established in the working group.

The investigation of the 9 different GPR55 mRNA splice variants listed in the NCBI and Ensembl EBI databases was initially carried out using bioinformatic alignments of the individual cDNA sequences to the GPR55 gene sequence. The latter was manually assembled as a hybrid sequence from the slightly different annotations from NCBI and Ensembl. Variant-specific qPCR primers were created and validated based on the alignments and exon boundaries. The expression of splice variants 1 (NM_005683.4; ENST00000650999.1) and 3 (XM_011512175.4) in Huh-7 cells was then identified using RT-qPCR and gel electrophoresis.

Subsequently, the expression levels of splice variants 1 and 3, as well as the overall expression of all GPR55 splice variants, were compared in HCV-transfected Huh-7 cells versus control cells. No significant differences were observed in the expression of GPR55 mRNA, neither for the individual variants 1 and 3 nor for the total of all splice variants, 48 hours after HCV transfection.

The validated GPR55 primers designed for the identified splice variants in Huh-7 cells are now a fundamental tool for further investigations into the Inc-ITM2C-1 - GPR55 - ISG

regulatory axis within the research group. These primers are currently being applied in studies involving GPR55 mRNA overexpression through plasmid systems.

The GPR55 gene annotation from NCBI was confirmed by the detection of splice variant 3. The deviating annotation from Ensembl EBI has not been adjusted to date (January 2025). According to the findings from this work, the listed GPR55 transcripts in the NCBI und Ensembl EBI databases should be critically revised and, if necessary, merged. The sequence boundaries of the gene annotation in Ensembl EBI should also be adjusted according to the annotation in NCBI.

8 Abkürzungsverzeichnis und Glossar

A	Adenin
Alignment	engl. für „Ausrichtung“ von Sequenzen, aneinander oder an einer Referenz-Sequenz
Apo	Apolipoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSL	Biologische Schutzstufe
C	Celsius
C	Cytosin
CB	Cannabinoidrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA, synthetisiert mittels des Enzyms Reverse Transkriptase als Abschrift einer RNA
<i>cis</i>	von der lateinischen Wurzel „cis“ = „auf derselben Seite wie“; Regulation, bei der ein Bereich der chromosomalen DNA die Transkription oder Expression eines Gens reguliert, das sich auf demselben Chromosom befindet
COP	coat protein complex, Mantel-Protein-Komplex
CRE	<i>Cis</i> -regulatorisches Element
Ct	Cycle threshold
d	Tag
DAA	Direct antiviral agents
ddH ₂ O	hausintern doppelt destilliertes Wasser
de novo	latein., „neu“ oder „von neuem“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
E	Effizienz
EGFR	Epidermal growth factor receptor
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMBL-EBI	European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute
EphA2	Ephrin type-A receptor 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinase

Exon-Exon-Primer bzw. Exon-Exon- Junction-Primer	Primer, der sich über die Exongrenzen einer mRNA Spleißvariante spannt
FASTA-Format	textbasiertes Format zur Darstellung und Speicherung der Primärstruktur von Nukleinsäuren und Proteinen durch einen Ein-Buchstaben-Code
G	Guanin
g	Gramm
g	relative Zentrifugalkraft (RCF) oder g-Kraft; die radiale Kraft, die vom rotierenden Rotor einer Zentrifuge erzeugt wird, ausgedrückt im Verhältnis zur Schwerkraft der Erde
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCSIR	GPR55 cis regulatory suppressor of immune response RNA
gDNA	genomische DNA
GPR55	G-protein coupled receptor 55
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HRP	Horseradish-Peroxidase = Meerrettich-Peroxidase
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN	Interferon
<i>in silico</i>	leitet sich von der Computerkomponente „Silicium“ ab; computerbasierte und mathematische Modelle, mit denen biochemische, physiologische, pharmakologische und toxikologische Vorgänge virtuell simuliert werden
<i>in vitro</i>	latein., = im Glas, außerhalb des Organismus unter künstlichen Bedingungen, im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	latein., = am lebenden (Objekt), innerhalb des oder am lebenden Organismus
Intron-spanning	Primer Set, bei dem Forward und Reverse Primer jeweils in unterschiedlichen Exons lokalisiert sind und der amplifizierte Bereich somit im Gen ein Intron überspannt
IRES	Internal ribosomal entry site, interne ribosomale Eintrittsstelle
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
ISG	Interferon stimulated genes
ITAF	IRES trans-agierende Faktoren
ITM2C	Integral Membrane Protein 2C

kanonisch	typische Eigenschaft oder die häufigste Variante eines Prozesses, eines Moleküls oder einer Sequenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Knockdown	Methode, bei der eine Genexpression von einem oder mehreren Genen einer Zelle oder eines Organismus durch RNA-Interferenz oder kompetitive Inhibition gemindert wird
l	Liter
LD	Lipid droplets, Lipidtröpfchen
LDL	Low density lipoprotein
lncRNA	long non-coding RNA
LPI	Lysophosphatidylinositol
LRI	long-range RNA-RNA interactions
LVP	Lipoviropartikel
M	Molar, mol/l
mA	Milliampere
MANE	Matched Annotation in NCBI und Ensembl
Met	Methionin
min	Minute
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MM	Mastermix
mock	Kontrollgruppe
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
noRT	Reverse Transkription ohne Zugabe von Reverser Transkriptase
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
ORF	Open reading frame, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PK	Proteinkinase
PRR	Pattern recognition receptors, Mustererkennungs-Rezeptoren
R2	Korrelationskoeffizient
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
S	Svedberg, Einheit der Sedimentationskonstanten zur Angabe des Molekulargewichtes von hochmolekularen Substanzen
s. / s. a.	siehe / siehe auch
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SL	Stem loop, Haarnadelschleife
STAT1 und 2	Signal transducer und activator of transcription 1 und 2
stock solution	Stammlösung
T	Thymin
TLR	Toll-like Rezeptor
TMD	Transmembrandomäne
Transfektion	Einbringen von fremder DNA oder RNA in eine Zelle
tRNA	transfer-RNA, Transport-RNA
TSL	Transcript Support Level
UPR	Unfolded protein response
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VLDL	Very low density lipoprotein
WB	Western Blot
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des HCV Genoms (Tabata et al, 2020).	3
Abbildung 2: Der HCV Replikationszyklus (Herker und Ott, 2011).	10
Abbildung 3: Antivirale Immunantwort gegen HCV in Hepatozyten (Gokhale et al., 2014).	11
Abbildung 4: Zusammenfassung der lncRNA Funktionen (Morlando et al., 2015).	17
Abbildung 5: Genomische Lokalisation von lnc-ITM2C-1 und die Lagebeziehung mit den Genen, die für ITM2C (Integral Membrane Protein 2C) und GPR55 (G-protein coupled receptor 55) kodieren (Hu, 2019).	19
Abbildung 6: Modell zur Veranschaulichung einer möglichen Kaskade, wie lnc-ITM2C-1 und GPR55 die Replikation von HCV durch die negative Regulation von antiviralen ISGs fördern (Hu et al., 2019).	21
Abbildung 7: Signalwege von GPR55 und Lysophosphatidylinositol (LPI) (Alhouayek et al., 2018).	23
Abbildung 8: GPR55 mRNA Nachweis in menschlichen Geweben (Uhlén et al., 2015).	28
Abbildung 9: Aufbau eines "wet tank" Transfers.	65
Abbildung 10: Beispiel einer Darstellung eines Alignments der mRNA Spleißvariante 3 an das GPR55 Gen.	67
Abbildung 11: (A) Ursprüngliches Protokoll zur RNA-Extraktion (B) 0,8%iges Agarosegel mit Gesamt RNA vor DNase Verdau (links) und nach DNase Verdau (rechts) im Mai 2022.	73
Abbildung 12: (A) Protokoll der RNA-Extraktion mit saurem Phenol und DNase-Verdau + RNase Inhibitor; (B) 0,8 % Agarosegel mit Gesamt RNA nach Verwendung des Protokolls aus A.	75
Abbildung 13: Verschiedene Protokolle im Troubleshooting.	76
Abbildung 14: 1%iges Agarosegel der Proben 1 - 6 der RNA-Extraktionen nach den im Text beschriebenen Protokollen.	77
Abbildung 15: RNA-Extraktionen ohne DNase-Verdau mit saurer Phenol-Chloroform-Extraktion.	77
Abbildung 16: Amplifikations- und Schmelzkurven der Protokolle 3, 4, 7 und 8.	79
Abbildung 17: Alternative Protokolle mit DNase Behandlung. DNase I von NEB (A) , DNase I von Thermo Fisher (B) , rDNase mit Inaktivierungsreagenz von Thermo Fisher (C)	80
Abbildung 18: RNA-Banden nach Anwendung verschiedener DNasen zur gDNA-Entfernung. .	81
Abbildung 19: RT-qPCR Amplifikations- und Schmelzkurven nach RNA Extraktion unter Verwendung der verschiedenen DNasen.	81
Abbildung 20: RNA-Banden nach Anwendung verschiedener saurer Phenole in der Phenol-Chloroform-Extraktion.	82

Abbildung 21: RT-qPCR Amplifikations- und Schmelzkurven nach RNA-Extraktion mittels Protokoll 7 unter Verwendung von saurem Phenol verschiedener Hersteller.	83
Abbildung 22: Alignment der GPR55 Gensequenzen aus Ensembl EBI (oben) und NCBI (unten) an die Sequenz des Chromosoms 2.	88
Abbildung 23: Alignment aller cDNAs der gelisteten GPR55 mRNAs an die Hybridsequenz der beiden Gensequenzen aus NCBI und Ensembl mit einer Gesamtlänge von 53.884 bp.....	89
Abbildung 24: Das 0,8%ige Agarosegel zeigt eine DNA-Bande, die länger als 10.000 bp ist, was für eine intakte gDNA spricht.	90
Abbildung 25: Primer Set für Spleißvariante 3 (Primer 4 und 5) mit Temperaturgradient der Anlagerungstemperatur.	91
Abbildung 26: Helping Primer am Beispiel der Spleißvariante 2.	92
Abbildung 27: Endpoint-PCR mit Primern von N. Grahn.	93
Abbildung 28: Primer Set 1	95
Abbildung 29: Primer Set 2	96
Abbildung 30: Primer Set 3	97
Abbildung 31: Primer Set 4	98
Abbildung 32: Primer Set 5	99
Abbildung 33: Primer Set 6	100
Abbildung 34: Primer Set 7	101
Abbildung 35: Primer Set 8	102
Abbildung 36: Primer Set 9	103
Abbildung 37: Primer Set 10	104
Abbildung 38: Primer Set 11	105
Abbildung 39: Primer Set 12	106
Abbildung 40: Primer Set 13	107
Abbildung 41: Primer Set 14	108
Abbildung 42: Standardkurve für Primer Set 4 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.	111
Abbildung 43: Standardkurve für Primer Set 5 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.	112
Abbildung 44: Standardkurve für Primer Set 6 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.	113
Abbildung 45: Standardkurve für Primer Set 7 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.	113
Abbildung 46: Standardkurve für Primer Set 8 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.	114

Abbildung 47: Standardkurve für Primer Set 10 nach 10-facher Verdünnungsreihe mit jeweils 2 technischen Replikaten.	115
Abbildung 48: Western Blot nach Transfektion Nr. 3 von Huh-7 Zellen mit full length HCV Genom (JC1 Plasmid).	117
Abbildung 49: Amplifikations- und Schmelzkurven von GAPDH (schwarz) und der noRT-Kontrolle (rot) aus den Transfektionsdurchgängen Nr. 3 (A) und Nr. 4 (B).	118
Abbildung 50: Relative Veränderung der Expression (Relative fold change) von GPR55 mRNA Spleißvarianten 48 h nach HCV full length RNA Transfektion in Huh-7 Zellen (miRNA122+JC1) vs. nach Transfektion von lediglich miRNA-122.	119
Abbildung 51: Alignment mit den neu annotierten Spleißvarianten X1, X2, X3 auf NCBI.	133
Abbildung 52: Alignment der Spleißvariante 1 (MANE) und der neu annotierten Variante X1.	133
Abbildung 53: Alignment der Spleißvariante 3 und der neu annotierten Variante X2 an der GPR55 Hybrid-Gensequenz.	134
Abbildung 54: Alignment der Spleißvariante 4 (3843 bp) und der neu annotierten Variante X3 (3846 bp).	134

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl an nicht-kodierenden RNAs und ihre Funktionen (Nordheim et al., 2018). .	14
Tabelle 2: GPR55 mRNA Spleißvarianten, Daten aus den internationalen Datenbanken NCBI und Ensembl EBI.	86
Tabelle 3: Neue Annotationen der GPR55 mRNA Spleißvarianten in NCBI, die erstmals im Februar 2023 gelistet wurden.	132

11 Literaturverzeichnis

- Albecka, A., Belouzard, S., De Beeck, A.O., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Duverlie, G., Rouillé, Y., Dubuisson, J., 2012. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 55, 998–1007. <https://doi.org/10.1002/hep.25501>
- Alberts, B., Heald, R., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2025. *Molekularbiologie der Zelle*, S. 364, Siebte Auflage. ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Alexander, S.P., Christopoulos, A., Davenport, A.P., Kelly, E., Marrion, N.V., Peters, J.A., Faccenda, E., Harding, S.D., Pawson, A.J., Sharman, J.L., Southan, C., Davies, J.A., CGTP Collaborators, 2017. The concise guide to pharmacology 2017/18: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology* 174, S17–S129. <https://doi.org/10.1111/bph.13878>
- Alhouayek, M., Masquelier, J., Muccioli, G.G., 2018. Lysophosphatidylinositols, from cell membrane constituents to GPR55 ligands. *Trends in Pharmacological Sciences* 39, 586–604. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.02.011>
- Amisten, S., Salehi, A., Rorsman, P., Jones, P.M., Persaud, S.J., 2013. An atlas and functional analysis of G-protein coupled receptors in human islets of Langerhans. *Pharmacology & Therapeutics* 139, 359–391. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.05.004>
- Andradas, C., Blasco-Benito, S., Castillo-Lluva, S., Dillenburg-Pilla, P., Diez-Alarcia, R., Juanes-García, A., García-Taboada, E., Hernando-Llorente, R., Soriano, J., Hamann, S., Weners, A., Alkatout, I., Klapper, W., Rocken, C., Bauer, M., Arnold, N., Quintanilla, M., Megías, D., Vicente-Manzanares, M., Urigüen, L., Gutkind, J.S., Guzmán, M., Pérez-Gómez, E., Sánchez, C., 2016. Activation of the orphan receptor GPR55 by lysophosphatidylinositol promotes metastasis in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 7, 47565–47575. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10206>
- Andradas, C., Caffarel, M.M., Pérez-Gómez, E., Salazar, M., Lorente, M., Velasco, G., Guzmán, M., Sánchez, C., 2011. The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene* 30, 245–252. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.402>
- Arnaud, N., Dabo, S., Akazawa, D., Fukasawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Hugon, J., Wakita, T., Meurs, E.F., 2011. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog* 7, e1002289. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002289>
- Arnaud, N., Dabo, S., Maillard, P., Budkowska, A., Kalliampakou, K.I., Mavromara, P., Garcin, D., Hugon, J., Gatignol, A., Akazawa, D., Wakita, T., Meurs, E.F., 2010. Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS ONE* 5, e10575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010575>
- Ayupe, A.C., Tahira, A.C., Camargo, L., Beckedorff, F.C., Verjovski-Almeida, S., Reis, E.M., 2015. Global analysis of biogenesis, stability and sub-cellular localization of lncRNAs mapping to intragenic regions of the human genome. *RNA Biology* 12, 877–892. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1062960>
- Bai, S., Nasser, M.W., Wang, B., Hsu, S.-H., Datta, J., Kutay, H., Yadav, A., Nuovo, G., Kumar, P., Ghoshal, K., 2009. microRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *Journal of*

- Biological Chemistry 284, 32015–32027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016774>
- Balenga, N.A., Martínez-Pinilla, E., Kargl, J., Schröder, R., Peinhaupt, M., Platzer, W., Bálint, Z., Zamarbide, M., Dopeso-Reyes, I.G., Ricobaraza, A., Pérez-Ortiz, J.M., Kostenis, E., Waldhoer, M., Heinemann, A., Franco, R., 2014. Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB2 receptors modulates signalling. *Br J Pharmacol* 171, 5387–5406. <https://doi.org/10.1111/bph.12850>
- Barriocanal, M., Carnero, E., Segura, V., Fortes, P., 2015. Long non-coding RNA BST2/BISPR is induced by IFN and regulates the expression of the antiviral factor tetherin. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00655>
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., André, P., 2011. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in Microbiology* 19, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.005>
- Behlke, M., 2016. Mini-review on current strategies to knockdown long non-coding RNAs. *J Rare Dis Res Treat* 1, 66–70. <https://doi.org/10.29245/2572-9411/2016/3.1066>
- Behrens, S.E., Tomei, L., De Francesco, R., 1996. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 15, 12–22.
- Beyoğlu, D., Schwalm, S., Semmo, N., Huwiler, A., Idle, J.R., 2023. Hepatitis C virus infection upregulates plasma phosphosphingolipids and endocannabinoids and downregulates lysophosphoinositols. *IJMS* 24, 1407. <https://doi.org/10.3390/ijms24021407>
- Bhanja Chowdhury, J., Shrivastava, S., Steele, R., Di Bisceglie, A.M., Ray, R., Ray, R.B., 2012. Hepatitis C virus infection modulates expression of interferon stimulatory gene IFITM1 by upregulating miR-130a. *J Virol* 86, 10221–10225. <https://doi.org/10.1128/JVI.00882-12>
- Binder, M., Quinkert, D., Bochkarova, O., Klein, R., Kezmic, N., Bartenschlager, R., Lohmann, V., 2007. Identification of determinants involved in initiation of hepatitis C virus RNA synthesis by using intergenotypic replicase chimeras. *J Virol* 81, 5270–5283. <https://doi.org/10.1128/JVI.00032-07>
- Bio-Rad Laboratories, 2006. Real-Time PCR Application Guide. [online] https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf (abgerufen am 19.12.24)
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., Rouillé, Y., 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80, 6964–6972. <https://doi.org/10.1128/JVI.00024-06>
- Blight, K.J., McKeating, J.A., Rice, C.M., 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76, 13001–13014. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.13001-13014.2002>
- Borgia, S.M., Hedskog, C., Parhy, B., Hyland, R.H., Stamm, L.M., Brainard, D.M., Subramanian, M.G., McHutchison, J.G., Mo, H., Svarovskaia, E., Shafran, S.D., 2018. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: Expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *The Journal of Infectious Diseases* 218, 1722–1729. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy401>
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R.G., Ratniner, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.-P., Penin, F., McLauchlan, J., 2006. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Journal of Biological Chemistry* 281, 22236–22247.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M601031200>

Bradburn, S., 2021. How to calculate PCR primer efficiencies. Top Tip Bio. [online] https://toptipbio.com/calculate-primer-efficiencies/?utm_content=cmp-true (abgerufen am 19.12.24).

Brown, E.A., Zhang, H., Ping, L.-H., Lemon, S.M., 1992. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucl Acids Res* 20, 5041–5045. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.5041>

Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T., Simmonds, P., 2024. Classification and genotype / subtype assignments of hepatitis C virus. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. [online] https://ictv.global/sg_wiki/flaviviridae/hepacivirus (abgerufen am 18.02.24).

Carnero, E., Barriocanal, M., Prior, C., Pablo Unfried, J., Segura, V., Guruceaga, E., Enguita, M., Smerdou, C., Gastaminza, P., Fortes, P., 2016. Long noncoding RNA EGOT negatively affects the antiviral response and favors HCV replication. *EMBO Rep* 17, 1013–1028. <https://doi.org/10.15252/embr.201541763>

Castanier, C., Garcin, D., Vazquez, A., Arnoult, D., 2010. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Reports* 11, 133–138. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.258>

Catanese, M.T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T.J., Andrus, L., Rice, W.J., Silvestry, M., Kuhn, R.J., Rice, C.M., 2013. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9505–9510. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307527110>

Čepin, U., 2017. Understanding qPCR efficiency and why it can exceed 100 %. *BioSistemika*. [online] <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/> (abgerufen am 19.12.24).

Chan, J.H., Lim, S., Wong, W.F., 2006. Antisense oligonucleotides: From design to therapeutic application. *Clin Exp Pharma Physio* 33, 533–540. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04403.x>

Chandler, D.E., Penin, F., Schulten, K., Chipot, C., 2012. The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS Comput Biol* 8, e1002702. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002702>

Chemie.de, 2024 Chaotrop [online] <https://www.chemie.de/lexikon/Chaotrop.html> (abgerufen am 19.12.24).

Chen, S., Kim, J.-K., 2024. The role of cannabidiol in liver disease: A systemic review. *IJMS* 25, 2370. <https://doi.org/10.3390/ijms25042370>

Chiurchiù, V., Lanuti, M., De Bardi, M., Battistini, L., Maccarrone, M., 2015. The differential characterization of GPR55 receptor in human peripheral blood reveals a distinctive expression in monocytes and NK cells and a proinflammatory role in these innate cells. *International Immunology* 27, 153–160. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu097>

Chomzynski, P., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>

Cipriano, A., Ballarino, M., 2018. The ever-evolving concept of the gene: The use of

- RNA/protein experimental techniques to understand genome functions. *Front. Mol. Biosci.* 5, 20. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00020>
- Coller, K.E., Berger, K.L., Heaton, N.S., Cooper, J.D., Yoon, R., Randall, G., 2009. RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog* 5, e1000702. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000702>
- Coulouarn, C., Factor, V.M., Andersen, J.B., Durkin, M.E., Thorgeirsson, S.S., 2009. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* 28, 3526–3536. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.211>
- Cristofari, G., 2004. The hepatitis C virus core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Research* 32, 2623–2631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh579>
- De Chasse, B., Navratil, V., Tafforeau, L., Hiet, M.S., Aublin-Gex, A., Agaugué, S., Meiffren, G., Pradezynski, F., Faria, B.F., Chantier, T., Le Breton, M., Pellet, J., Davoust, N., Mangeot, P.E., Chaboud, A., Penin, F., Jacob, Y., Vidalain, P.O., Vidal, M., André, P., Roubourdin-Combe, C., Lotteau, V., 2008. Hepatitis C virus infection protein network. *Molecular Systems Biology* 4, 230. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.66>
- De Leuw, P., Stephan, C., 2018. Protease inhibitor therapy for hepatitis C virus-infection. *Expert opinion on pharmacotherapy* 19, 577–587. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1454428>
- Dmitriev, S.E., Terenin, I.M., Andreev, D.E., Ivanov, P.A., Dunaevsky, J.E., Merrick, W.C., Shatsky, I.N., 2010. GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal p-site by a novel eukaryotic translation factor. *Journal of Biological Chemistry* 285, 26779–26787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.119693>
- Doench, J.G., Petersen, C.P., Sharp, P.A., 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 17, 438–442. <https://doi.org/10.1101/gad.1064703>
- Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S.F., Chisari, F.V., 2009. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14046–14051. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907344106>
- Duong, F.H.T., Filipowicz, M., Tripodi, M., La Monica, N., Heim, M.H., 2004. Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology* 126, 263–277. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.10.076>
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K., 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76, 5974–5984. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.12.5974-5984.2002>
- Einav, S., Gerber, D., Bryson, P.D., Sklan, E.H., Elazar, M., Maerkl, S.J., Glenn, J.S., Quake, S.R., 2008. Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat Biotechnol* 26, 1019–1027. <https://doi.org/10.1038/nbt.1490>
- EMBL-EBI, 2024. Ensembl Glossary [online] <https://www.ensembl.org/info/website/glossary.html> (abgerufen am 28.02.24).
- EMBL-EBI, 2022. Gene: GPR55 (ENSG00000135898). Ensembl. [online] https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000135898

98;r=2:230907318-230925226;t=ENST00000444078 (abgerufen am 13.04.22).

Enjoji, 2011. Association between lipid accumulation and the cannabinoid system in Huh7 cells expressing HCV genes. *Int J Mol Med* 27. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.622>

Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., Subramaniam, A., Propp, S., Lollo, B.A., Freier, S., Bennett, C.F., Bhanot, S., Monia, B.P., 2006. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metabolism* 3, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.005>

Falasca, M., Ferro, R., 2016. Role of the lysophosphatidylinositol/GPR55 axis in cancer. *Advances in Biological Regulation* 60, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.10.003>

Fan, J., Cheng, M., Chi, X., Liu, X., Yang, W., 2019. A human long non-coding RNA IncATV promotes virus replication through restricting RIG-I mediated innate immunity. *Front. Immunol.* 10, 1711. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01711>

Ferraris, P., Blanchard, E., Roingeard, P., 2010. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *Journal of General Virology* 91, 2230–2237. <https://doi.org/10.1099/vir.0.022186-0>

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>

Fondevila, M.F., Fernandez, U., Gonzalez-Rellan, M.J., Da Silva Lima, N., Buque, X., Gonzalez-Rodriguez, A., Alonso, C., Iruarrizaga-Lejarreta, M., Delgado, T.C., Varela-Rey, M., Senra, A., Garcia-Outeiral, V., Novoa, E., Iglesias, C., Porteiro, B., Beiroa, D., Folgueira, C., Tojo, M., Torres, J.L., Hernández-Cosido, L., Blanco, Ó., Arab, J.P., Barrera, F., Guallar, D., Fidalgo, M., López, M., Dieguez, C., Marcos, M., Martinez-Chantar, M.L., Arrese, M., Garcia-Monzon, C., Mato, J.M., Aspichueta, P., Nogueiras, R., 2021. The L- α -lysophosphatidylinositol/G protein-coupled receptor 55 system induces the development of nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. *Hepatology* 73, 606–624. <https://doi.org/10.1002/hep.31290>

Foster, S.R., Hauser, A.S., Vedel, L., Strachan, R.T., Huang, X.-P., Gavin, A.C., Shah, S.D., Nayak, A.P., Haugaard-Kedström, L.M., Penn, R.B., Roth, B.L., Bräuner-Osborne, H., Gloriam, D.E., 2019. Discovery of human signaling systems: Pairing peptides to G protein-coupled receptors. *Cell* 179, 895-908.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.010>

Frenking, G., Chaotrop, RD-03-01069 (2004) in Böckler, F., Dill, B., Eisenbrand, G., Faupel, F., Fugmann, B., Gamse, T., Heretsch, P., Matissek, R., Pohnert, G., Rühling, A., Schmidt S., Sprenger, G., RÖMPP [online], Stuttgart, Georg Thieme Verlag, März 2025. <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-03-01069>

Fricke, M., Dünnes, N., Zayas, M., Bartenschlager, R., Niepmann, M., Marz, M., 2015. Conserved RNA secondary structures and long-range interactions in hepatitis C viruses. *RNA* 21, 1219–1232. <https://doi.org/10.1261/rna.049338.114>

Friebe, P., Bartenschlager, R., 2002. Genetic Analysis of Sequences in the 3' Nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76, 5326–5338. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.11.5326-5338.2002>

Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J.-P., Bartenschlager, R., 2005. Kissing-loop interaction

- in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* 79, 380–392. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.380-392.2005>
- Galiazzo, G., Giancola, F., Stanzani, A., Fracassi, F., Bernardini, C., Forni, M., Pietra, M., Chiocchetti, R., 2018. Localization of cannabinoid receptors CB1, CB2, GPR55, and PPAR α in the canine gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* 150, 187–205. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1684-7>
- Garaigorta, U., Chisari, F.V., 2009. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host & Microbe* 6, 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.11.004>
- Gastaminza, P., Dryden, K.A., Boyd, B., Wood, M.R., Law, M., Yeager, M., Chisari, F.V., 2010. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol* 84, 10999–11009. <https://doi.org/10.1128/JVI.00526-10>
- Gokhale, N.S., Vazquez, C., Horner, S.M., 2014. Hepatitis C virus: Strategies to evade antiviral responses. *Future Virology* 9, 1061–1075. <https://doi.org/10.2217/fvl.14.89>
- Gouklani, H., Bull, R.A., Beyer, C., Coulibaly, F., Gowans, E.J., Drummer, H.E., Netter, H.J., White, P.A., Haqshenas, G., 2012. Hepatitis C virus nonstructural protein 5B is involved in virus morphogenesis. *J Virol* 86, 5080–5088. <https://doi.org/10.1128/JVI.07089-11>
- Grahn, N., 2022. Etablierung von Spleißvarianten-spezifischen RT-PCRs für die lange nichtcodierende RNA Inc-ITM2C-1 und für GPR55-mRNA. Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.
- Guerrero-Alba, R., Barragán-Iglesias, P., González-Hernández, A., Valdez-Morales, E.E., Granados-Soto, V., Condés-Lara, M., Rodríguez, M.G., Marichal-Cancino, B.A., 2019. Some prospective alternatives for treating pain: The endocannabinoid system and its putative receptors GPR18 and GPR55. *Front. Pharmacol.* 9, 1496. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01496>
- Haid, S., Pietschmann, T., Pécheur, E.-I., 2009. Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *Journal of Biological Chemistry* 284, 17657–17667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014647>
- Han, J.-Q., Barton, D.J., 2002. Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA* 8, 512–525. <https://doi.org/10.1017/S1355838202020617>
- Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G.L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M.J., Mee, C.J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., Balfe, P., McKeating, J.A., 2010. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *Journal of Biological Chemistry* 285, 21092–21102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104836>
- Harshitha, R., Arunraj, D.R., 2021. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Molecular Bio Educ* 49, 800–812. <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>
- Hasenoehrl, C., Feuersinger, D., Kienzl, M., Schicho, R., 2019. GPR55-mediated effects in colon cancer cell lines. *Med Cannabis Cannabinoids* 2, 22–28. <https://doi.org/10.1159/000496356>
- Hasenoehrl, C., Feuersinger, D., Sturm, E.M., Bärnthaler, T., Heitzer, E., Graf, R., Grill, M., Pichler, M., Beck, S., Butcher, L., Thomas, D., Ferreirós, N., Schuligoi, R.,

- Schweiger, C., Haybaeck, J., Schicho, R., 2018. G protein-coupled receptor GPR55 promotes colorectal cancer and has opposing effects to cannabinoid receptor 1: GPR55 drives colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 142, 121–132. <https://doi.org/10.1002/ijc.31030>
- He, D., Wang, J., Zhang, C., Shan, B., Deng, X., Li, B., Zhou, Y., Chen, W., Hong, J., Gao, Y., Chen, Z., Duan, C., 2015. Down-regulation of miR-675-5p contributes to tumor progression and development by targeting pro-tumorigenic GPR55 in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 14, 73. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0342-0>
- Helbig, K.J., Lau, D.T.-Y., Semendric, L., Harley, H.A.J., Beard, M.R., 2005. Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology* 42, 702–710. <https://doi.org/10.1002/hep.20844>
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., Niepmann, M., 2008. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27, 3300–3310. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.244>
- Henstridge, C.M., Balenga, N.A.B., Ford, L.A., Ross, R.A., Waldhoer, M., Irving, A.J., 2009. The GPR55 ligand L- α -lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB j.* 23, 183–193. <https://doi.org/10.1096/fj.08-108670>
- Henstridge, C.M., Brown, A.J., Waldhoer, M., 2016. GPR55: Metabolic help or hindrance? *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27, 606–608. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.04.012>
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., Ott, M., 2010. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* 16, 1295–1298. <https://doi.org/10.1038/nm.2238>
- Herker, E., Ott, M., 2011. Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 22, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.03.004>
- Holschbach, M., 2024. Western Blot: Gelelektrophorese für Proteine. *antikoerper-online.de*. [online] <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1224/western-blot-gelelektrophorese-fuer-proteine/>. (abgerufen am 18.12.2024)
- Hu, P., Wilhelm, J., Gerresheim, G., Shalamova, L., Niepmann, M., 2019. Lnc-ITM2C-1 and GPR55 are proviral host factors for hepatitis C virus. *Viruses* 11, 549. <https://doi.org/10.3390/v11060549>
- Hu, P., 2019. Lnc-ITM2C-1 and GPR55 Are Proviral Host Factors for Hepatitis C Virus. Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Ye, J., 2007. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5848–5853. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700760104>
- Huang, L., Ramirez, J.C., Frampton, G.A., Golden, L.E., Quinn, M.A., Pae, H.Y., Horvat, D., Liang, L., DeMorrow, S., 2011. Anandamide exerts its antiproliferative actions on cholangiocarcinoma by activation of the GPR55 receptor. *Laboratory Investigation* 91, 1007–1017. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.62>
- ICTV, 2024. International Committee on Taxonomy of Viruses [online] <https://ictv.global>

(abgerufen am 18.02.24).

Im, D.-S., 2021. GPR119 and GPR55 as receptors for fatty acid ethanolamides, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide. *IJMS* 22, 1034. <https://doi.org/10.3390/ijms22031034>

Integrated DNA Technologies, 2024. OligoAnalyser. Integrated DNA Technologies, Inc. [online] https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?utm_source=google&utm_medium=cp&utm_campaign=00588_1i_03&utm_content=search&gclid=Cj0KCQjwgLOiBhC7ARIsAleetVAK2uaHISQrv0ckxQdx3FpDDkAMklmpSxXkP-84hgQbWh8AtStl8EkaAuUwEALw_wcB (abgerufen am 09.03.2024)

Ismail, H.T.H., AbdelMageed, M., Lindmark, G., Hammarström, M.-L., Hammarström, S., Sitohy, B., 2022. Prognostic significance of GPR55 mRNA expression in colon cancer. *IJMS* 23, 4556. <https://doi.org/10.3390/ijms23094556>

Ito, T., Tahara, S.M., Lai, M.M.C., 1998. The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol.* 72, 8789–8796. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8789-8796.1998>

Ivashkiv, L.B., Donlin, L.T., 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14, 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>

Jiang, M., Broering, R., Trippler, M., Wu, J., Zhang, E., Zhang, X., Gerken, G., Lu, M., Schlaak, J.F., 2014. microRNA-155 controls Toll-like receptor 3- and hepatitis C virus-induced immune responses in the liver. *Journal of Viral Hepatitis* 21, 99–110. <https://doi.org/10.1111/jvh.12126>

Jin, C., Chen, H., Xie, L., Zhou, Y., Liu, L., Wu, J., 2024. GPCRs involved in metabolic diseases: Pharmacotherapeutic development updates. *Acta Pharmacol Sin* 45, 1321–1336. <https://doi.org/10.1038/s41401-023-01215-2>

Jirasko, V., Montserret, R., Appel, N., Janvier, A., Eustachi, L., Brohm, C., Steinmann, E., Pietschmann, T., Penin, F., Bartenschlager, R., 2008. Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *Journal of Biological Chemistry* 283, 28546–28562. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803981200>

Jones, D.M., Patel, A.H., Targett-Adams, P., McLauchlan, J., 2009. The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *J Virol* 83, 2163–2177. <https://doi.org/10.1128/JVI.01885-08>

Jopling, C., 2012. Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biology* 9, 137–142. <https://doi.org/10.4161/rna.18827>

Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., Sarnow, P., 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 309, 1577–1581. <https://doi.org/10.1126/science.1113329>

Kallendrusch, S., Kremzow, S., Nowicki, M., Grabiec, U., Winkelmann, R., Benz, A., Kraft, R., Bechmann, I., Dehghani, F., Koch, M., 2013. The G protein-coupled receptor 55 ligand L- α -lysophosphatidylinositol exerts microglia-dependent neuroprotection after excitotoxic lesion. *Glia* 61, 1822–1831. <https://doi.org/10.1002/glia.22560>

Kalwa, M., Hänzelmann, S., Otto, S., Kuo, C.-C., Franzen, J., Jousen, S., Fernandez-Rebollo, E., Rath, B., Koch, C., Hofmann, A., Lee, S.-H., Teschendorff, A.E., Denecke,

- B., Lin, Q., Widschwendter, M., Weinhold, E., Costa, I.G., Wagner, W., 2016. The lncRNA HOTAIR impacts on mesenchymal stem cells via triple helix formation. *Nucleic Acids Res* 44, 10631–10643. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw802>
- Kambara, H., Niazi, F., Kostadinova, L., Moonka, D.K., Siegel, C.T., Post, A.B., Carnero, E., Barriocanal, M., Fortes, P., Anthony, D.D., Valadkhan, S., 2014. Negative regulation of the interferon response by an interferon-induced long non-coding RNA. *Nucleic Acids Research* 42, 10668–10680. <https://doi.org/10.1093/nar/gku713>
- Kargl, J., Balenga, N., Parzmair, G.P., Brown, A.J., Heinemann, A., Waldhoer, M., 2012. The cannabinoid receptor CB1 modulates the signaling properties of the lysophosphatidylinositol receptor GPR55. *Journal of Biological Chemistry* 287, 44234–44248. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364109>
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00801-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00801-8)
- Kim, J.H., Park, S.M., Park, J.H., Keum, S.J., Jang, S.K., 2011. eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *The EMBO Journal* 30, 2454–2464. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.146>
- Kim, S.-J., Syed, G.H., Khan, M., Chiu, W.-W., Sohail, M.A., Gish, R.G., Siddiqui, A., 2014. Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 6413–6418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321114111>
- Kitamura, C., Sonoda, H., Anzai, H., Nagai, Y., Abe, S., Yokoyama, Y., Ishii, H., Kishikawa, J., Emoto, S., Muro, K., Sasaki, K., Kawai, K., Nozawa, H., Ishihara, S., 2021. Expression of lysophosphatidylinositol signaling-relevant molecules in colorectal cancer. *Anticancer Res* 41, 2349–2355. <https://doi.org/10.21873/anticancer.15009>
- Kulkarni, V., Jayakumar, S., Mohan, M., Kulkarni, S., 2023. Aid or antagonize: Nuclear long noncoding RNAs regulate host responses and outcomes of viral infections. *Cells* 12, 987. <https://doi.org/10.3390/cells12070987>
- Kutay, H., Bai, S., Datta, J., Motiwala, T., Pogribny, I., Frankel, W., Jacob, S.T., Ghoshal, K., 2006. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J of Cellular Biochemistry* 99, 671–678. <https://doi.org/10.1002/jcb.20982>
- Laschet, C., Dupuis, N., Hanson, J., 2018. The G protein-coupled receptors deorphanization landscape. *Biochemical Pharmacology* 153, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.016>
- Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.-Y., Lu, H.-C., Hille, B., Mackie, K., 2008. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2699–2704. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711278105>
- Lehninger, A.L., 1975. *Biochemistry: The molecular basis of cell structure and function*, 2d ed. ed. Worth Publishers, New York.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C.M., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Lemon, S.M., 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2992–2997. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408824102>
- Li, K., Li, N.L., Wei, D., Pfeffer, S.R., Fan, M., Pfeffer, L.M., 2012. Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected

- hepatocytes depends on toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. *Hepatology* 55, 666–675. <https://doi.org/10.1002/hep.24763>
- Li, X.-D., Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., Chen, Z.J., 2005. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17717–17722. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508531102>
- Liu, C.-H., Kao, J.-H., 2023. Acute hepatitis C virus infection: Clinical update and remaining challenges. *Clin Mol Hepatol* 29, 623–642. <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0349>
- Liu, X., Duan, X., Holmes, J.A., Li, W., Lee, S.H., Tu, Z., Zhu, C., Salloum, S., Lidofsky, A., Schaefer, E.A., Cai, D., Li, S., Wang, H., Huang, Y., Zhao, Y., Yu, M., Xu, Z., Chen, L., Hong, J., Lin, W., Chung, R.T., 2019. A long noncoding RNA regulates hepatitis C virus infection through interferon alpha-inducible protein 6. *Hepatology* 69, 1004–1019. <https://doi.org/10.1002/hep.30266>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Locker, N., Easton, L.E., Lukavsky, P.J., 2007. HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *EMBO J* 26, 795–805. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601549>
- Lohmann, V., 2013. Hepatitis C virus RNA replication, in: Bartenschlager, R. (Ed.), *Hepatitis C virus: From molecular virology to antiviral therapy*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 167–198. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_7
- Lohmann, V., Körner, F., Herian, U., Bartenschlager, R., 1997. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* 71, 8416–8428. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8416-8428.1997>
- Lowe, Henryl.C., Toyang, N., McLaughlin, W., 2017. Potential of cannabidiol for the treatment of viral hepatitis. *Phcog Res* 9, 116. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.199780>
- Madan, V., Bartenschlager, R., 2015. Structural and functional properties of the hepatitis C virus p7 viroporin. *Viruses* 7, 4461–4481. <https://doi.org/10.3390/v7082826>
- Marquez, R.T., Bandyopadhyay, S., Wendlandt, E.B., Keck, K., Hoffer, B.A., Icardi, M.S., Christensen, R.N., Schmidt, W.N., McCaffrey, A.P., 2010. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Laboratory Investigation* 90, 1727–1736. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.126>
- Masquelier, J., Alhouayek, M., Terrasi, R., Bottemanne, P., Paquot, A., Muccioli, G.G., 2018. Lysophosphatidylinositols in inflammation and macrophage activation: Altered levels and anti-inflammatory effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1863, 1458–1468. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.09.003>
- Mattick, J.S., Amaral, P.P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H.Y., Chen, L.-L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M.E., Fitzgerald, K.A., Gingeras, T.R., Guttman, M., Hirose, T.,

Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J.B., Lee, J.T., Mendell, J.T., Mercer, T.R., Moore, K.J., Nakagawa, S., Rinn, J.L., Spector, D.L., Ulitsky, I., Wan, Y., Wilusz, J.E., Wu, M., 2023. Long non-coding RNAs: Definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24, 430–447. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>

McKillop, A.M., Moran, B.M., Abdel-Wahab, Y.H.A., Flatt, P.R., 2013. Evaluation of the insulin releasing and antihyperglycaemic activities of GPR55 lipid agonists using clonal beta-cells, isolated pancreatic islets and mice: GPR55 agonists and insulin secretion. *Br J Pharmacol* 170, 978–990. <https://doi.org/10.1111/bph.12356>

Menzel, N., Fischl, W., Hueging, K., Bankwitz, D., Frentzen, A., Haid, S., Gentzsch, J., Kaderali, L., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., 2012. MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog* 8, e1002829. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002829>

Merck, 2024. PCR-Assay-Optimierung und Validierung [online] <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/assay-optimization-and-validation> (abgerufen am 01.09.24).

Meridian Bioscience, 2024. RNA hits and tips [online] <https://www.bioline.com/rna-hints-and-tips> (abgerufen am 01.09.24).

Metz, P., Reuter, A., Bender, S., Bartenschlager, R., 2013. Interferon-stimulated genes and their role in controlling hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* 59, 1331–1341. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.033>

Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., Tschopp, J., 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167–1172. <https://doi.org/10.1038/nature04193>

Mondal, T., Subhash, S., Vaid, R., Enroth, S., Uday, S., Reinius, B., Mitra, S., Mohammed, A., James, A.R., Hoberg, E., Moustakas, A., Gyllenstein, U., Jones, S.J.M., Gustafsson, C.M., Sims, A.H., Westerlund, F., Gorab, E., Kanduri, C., 2015. MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF- β pathway genes through formation of RNA–DNA triplex structures. *Nat Commun* 6, 7743. <https://doi.org/10.1038/ncomms8743>

Moradpour, D., Englert, C., Wakita, T., Wands, J.R., 1996. Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology* 222, 51–63. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0397>

Moradpour, D., Penin, F., 2013. Hepatitis C virus proteins: From structure to function, in: Bartenschlager, R. (Ed.), *Hepatitis C virus: From molecular virology to antiviral therapy*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 113–142. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_5

Morales, J., Pujar, S., Loveland, J.E., Astashyn, A., Bennett, R., Berry, A., Cox, E., Davidson, C., Ermolaeva, O., Farrell, C.M., Fatima, R., Gil, L., Goldfarb, T., Gonzalez, J.M., Haddad, D., Hardy, M., Hunt, T., Jackson, J., Joardar, V.S., Kay, M., Kodali, V.K., McGarvey, K.M., McMahon, A., Mudge, J.M., Murphy, D.N., Murphy, M.R., Rajput, B., Rangwala, S.H., Riddick, L.D., Thibaud-Nissen, F., Threadgold, G., Vatsan, A.R., Wallin, C., Webb, D., Flicek, P., Birney, E., Pruitt, K.D., Frankish, A., Cunningham, F., Murphy, T.D., 2022. A joint NCBI and EMBL-EBI transcript set for clinical genomics and research. *Nature* 604, 310–315. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04558-8>

- Moreno, E., Andradas, C., Medrano, M., Caffarel, M.M., Pérez-Gómez, E., Blasco-Benito, S., Gómez-Cañas, M., Pazos, M.R., Irving, A.J., Lluís, C., Canela, E.I., Fernández-Ruiz, J., Guzmán, M., McCormick, P.J., Sánchez, C., 2014. Targeting CB2-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling. *Journal of Biological Chemistry* 289, 21960–21972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.561761>
- Morikawa, K., Lange, C.M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F., Moradpour, D., 2011. Nonstructural protein 3-4A: the swiss army knife of hepatitis C virus. *Journal of Viral Hepatitis* 18, 305–315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2011.01451.x>
- Morlando, M., Ballarino, M., Fatica, A., 2015. Long non-coding RNAs: New players in hematopoiesis and leukemia. *Front. Med.* 2. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00023>
- Murray, C.L., Jones, C.T., Rice, C.M., 2008. Architects of assembly: Roles of flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* 6, 699–708. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1928>
- NCBI, 2024. Homo sapiens G protein-coupled receptor 55 (GPR55), mRNA (NM_005683.4) [online] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_005683.4/ (abgerufen am 01.09.24).
- NCBI, 2022a. Nucleotide-BLAST [online] https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (abgerufen am 09.03.24)
- NCBI, 2022b. Primer-BLAST [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi> (abgerufen am 09.03.24)
- NCBI, 2022c. GPR55 - Transcripts and proteins [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/gene/id/9290/products/> (abgerufen am 13.04.22).
- New England Biolabs Inc., 2024. Avoiding ribonuclease contamination [online] <https://www.neb.com/en/tools-and-resources/usage-guidelines/avoiding-ribonuclease-contamination> (abgerufen am 01.09.24).
- Nieder-Röhrmann, A., Dünnes, N., Gerresheim, G.K., Shalamova, L.A., Herchenröther, A., Niepmann, M., 2017. Cooperative enhancement of translation by two adjacent microRNA-122/Argonaute 2 complexes binding to the 5' untranslated region of hepatitis C virus RNA. *Journal of General Virology* 98, 212–224. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000697>
- Niepmann, M., 2013. Hepatitis C virus RNA translation, in: Bartenschlager, R. (Ed.), *Hepatitis C virus: From molecular virology to antiviral therapy*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 143–166. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_6
- Niepmann, M., 2009. Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA. *Cell Cycle* 8, 1473–1477. <https://doi.org/10.4161/cc.8.10.8349>
- Niepmann, M., Gerresheim, G.K., 2020. Hepatitis C virus translation regulation. *IJMS* 21, 2328. <https://doi.org/10.3390/ijms21072328>
- Niepmann, M., Shalamova, L.A., Gerresheim, G.K., Rossbach, O., 2018. Signals involved in regulation of hepatitis C virus RNA genome translation and replication. *Front. Microbiol.* 9, 395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00395>

- Nishitsuji, H., Ujino, S., Yoshio, S., Sugiyama, M., Mizokami, M., Kanto, T., Shimotohno, K., 2016. Long noncoding RNA #32 contributes to antiviral responses by controlling interferon-stimulated gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 10388–10393. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525022113>
- Nordheim, A., Knippers, R., Dröge, P., Meister, G., Schiebel, E., Vingron, M., Walter, J. (Eds.), 2018. *Molekulare Genetik*, 11., unveränderte Auflage. ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
- Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., Sugiura, T., 2007. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362, 928–934. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.078>
- Oka, S., Toshida, T., Maruyama, K., Nakajima, K., Yamashita, A., Sugiura, T., 2008. 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: A possible natural ligand for GPR55. *Journal of Biochemistry* 145, 13–20. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn136>
- Omura, H., Liu, F., Shimakami, T., Murai, K., Shirasaki, T., Kitabayashi, J., Funaki, M., Nishikawa, T., Nakai, R., Sumiyadorj, A., Hayashi, T., Yamashita, T., Honda, M., Kaneko, S., 2019. Establishment and characterization of a new cell line permissive for hepatitis C virus infection. *Sci Rep* 9, 7943. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44257-5>
- Oswald, N., 2013. RNases: Their baddie super-powers explained (and how you can defeat them) [online] <https://bitesizebio.com/13528/rnases-their-baddie-super-powers-explained-and-how-you-can-defeat-them/> (abgerufen am 01.09.24).
- Ouyang, J., Hu, J., Chen, J., 2016. LncRNAs regulate the innate immune response to viral infection. *WIREs RNA* 7, 129–143. <https://doi.org/10.1002/wrna.1321>
- Ouyang, J., Zhu, X., Chen, Y., Wei, H., Chen, Q., Chi, X., Qi, B., Zhang, L., Zhao, Y., Gao, G.F., Wang, G., Chen, J.-L., 2014. NRAV, a long noncoding RNA, modulates antiviral responses through suppression of interferon-stimulated gene transcription. *Cell Host & Microbe* 16, 616–626. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.001>
- Palmer, M., Prediger, E., n.d. Assessing RNA quality. [online] <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/assessing-rna-quality.html> (abgerufen am 17.12.24)
- Pašalić, D., Orct, T., Piasek, M., Mioč, T., Stasenko, S., Kovačić, J., Jurasović, J., Dorotić, A., Sekovanić, A., 2021. Pre-amplification as a method for improvement of quantitative RT-PCR analysis of circulating miRNAs. *Biochem. med. (Online)* 31, 143–148. <https://doi.org/10.11613/BM.2021.010901>
- Patsenker, E., Sachse, P., Chicca, A., Gachet, M., Schneider, V., Mattsson, J., Lanz, C., Worni, M., De Gottardi, A., Semmo, M., Hampe, J., Schafmayer, C., Brenneisen, R., Gertsch, J., Stickel, F., Semmo, N., 2015. Elevated levels of endocannabinoids in chronic hepatitis C may modulate cellular immune response and hepatic stellate cell activation. *IJMS* 16, 7057–7076. <https://doi.org/10.3390/ijms16047057>
- Pelley, J., 2017. Tracing the chemistry of household dust. *c&en* 95. [online] <https://cen.acs.org/articles/95/i7/Tracing-chemistry-household-dust.html> (abgerufen am 01.09.24)
- Pène, V., Li, Q., Sodroski, C., Hsu, C.-S., Liang, T.J., 2015. Dynamic interaction of stress granules, DDX3X, and IKK- α mediates multiple functions in hepatitis C virus infection. *J Virol* 89, 5462–5477. <https://doi.org/10.1128/JVI.03197-14>

- Pertwee, R.G., Howlett, A.C., Abood, M.E., Alexander, S.P.H., Di Marzo, V., Elphick, M.R., Greasley, P.J., Hansen, H.S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., Ross, R.A., 2010. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev* 62, 588–631. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003004>
- Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., 1998. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* 12, 67–83. <https://doi.org/10.1101/gad.12.1.67>
- Petit, F., Donlan, M., Michel, A., 2006. GPR55 as a new cannabinoid receptor: Still a long way to prove it. *Chem Biol Drug Design* 67, 252–253. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2006.00370.x>
- Pflugheber, J., Fredericksen, B., Sumpter, R., Wang, C., Ware, F., Sodora, D.L., Gale, M., 2002. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4650–4655. <https://doi.org/10.1073/pnas.062055699>
- Pietr, M., Kozela, E., Levy, R., Rimmerman, N., Lin, Y.H., Stella, N., Vogel, Z., Juknat, A., 2009. Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Letters* 583, 2071–2076. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.028>
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.-L., Bartenschlager, R., 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7408–7413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504877103>
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S., 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938–941. <https://doi.org/10.1126/science.282.5390.938>
- Piñeiro, R., Maffucci, T., Falasca, M., 2011. The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene* 30, 142–152. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.417>
- Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Hélot, L., Rouillé, Y., Dubuisson, J., 2011. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* 7, e1001278. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001278>
- Postepska-Igielska, A., Giwojna, A., Gasri-Plotnitsky, L., Schmitt, N., Dold, A., Ginsberg, D., Grummt, I., 2015. LncRNA Khps1 regulates expression of the proto-oncogene SPHK1 via triplex-mediated changes in chromatin structure. *Molecular Cell* 60, 626–636. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.001>
- Qian, X., Xu, C., Zhao, P., Qi, Z., 2016. Long non-coding RNA GAS5 inhibited hepatitis C virus replication by binding viral NS3 protein. *Virology* 492, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.02.020>
- Quinn, J.J., Chang, H.Y., 2016. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet* 17, 47–62. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10>
- Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., De Ruiter, P.E., Willemsen, R., Demmers, J.A.A., Stalin Raj, V., Jenster, G., Kwekkeboom, J., Tilanus, H.W., Haagmans, B.L., Baumert, T.F., Van Der Laan, L.J.W., 2013. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 13109–13113.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1221899110>
- Raney, K.D., Sharma, S.D., Moustafa, I.M., Cameron, C.E., 2010. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): A multifunctional antiviral target. *Journal of Biological Chemistry* 285, 22725–22731. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.125294>
- Ransohoff, J.D., Wei, Y., Khavari, P.A., 2018. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 143–157.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.104>
- Research Gate, 2016. When reverse transcribing rRNA to synthesise cDNA before making PCR amplicons, should I use gene specific primers, or random/heximer primers? Research Gate. [online]
https://www.researchgate.net/post/When_reverse_transcribing_rRNA_to_synthesise_cDNA_before_making_PCR_amplicons_should_I_use_gene_specific_primers_or_random_heximer_primers (abgerufen am 01.09.24).
- Roger, S., Ducancelle, A., Le Guillou-Guillemette, H., Gaudy, C., Lunel, F., 2021. HCV virology and diagnosis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 45, 101626. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101626>
- Roingear, P., Beaumont, E., 2020. Hepatitis C vaccine: 10 good reasons for continuing. *Hepatology* 71, 1845–1850. <https://doi.org/10.1002/hep.31182>
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., Walther, P., Antony, C., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., 2012. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 8, e1003056. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003056>
- Romero-Zerbo, S.Y., Rafacho, A., Díaz-Arteaga, A., Suárez, J., Quesada, I., Imbernon, M., Ross, R.A., Dieguez, C., Rodríguez de Fonseca, F., Nogueiras, R., Nadal, Á., Bermúdez-Silva, F.J., 2011. A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology* 211, 177–185.
<https://doi.org/10.1530/JOE-11-0166>
- Ross, R.A., 2009. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends in Pharmacological Sciences* 30, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.12.004>
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J., 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor: GPR55, a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology* 152, 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>
- Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., Gale, M., 2008. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 454, 523–527. <https://doi.org/10.1038/nature07106>
- Sandhu, K.S., Acharya, K.K., 2005. ExPrimer: To design primers from exon-exon junctions. *Bioinformatics* 21, 2091–2092. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti304>
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D.K., Lynch, K.R., Cheng, R., Heng, H.H.Q., George, S.R., O'Dowd, B.F., 1999. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, Ψ GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Molecular Brain Research* 64, 193–198.
[https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00277-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00277-0)

- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., Vitelli, A., 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21, 5017–5025. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf529>
- Schicho, R., Bashashati, M., Bawa, M., McHugh, D., Saur, D., Hu, H.-M., Zimmer, A., Lutz, B., Mackie, K., Bradshaw, H.B., McCafferty, D.-M., Sharkey, K.A., Storr, M., 2011. The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment: *Inflammatory Bowel Diseases* 17, 1651–1664. <https://doi.org/10.1002/ibd.21538>
- Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hügler, T., Penin, F., Rice, C.M., Blum, H.E., Moradpour, D., 2001. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 44052–44063. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103358200>
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., Rice, C.M., 2014. Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00759-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00759-1)
- Sesmero, E., Thorpe, I., 2015. Using the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase as a model to understand viral polymerase structure, function and dynamics. *Viruses* 7, 3974–3994. <https://doi.org/10.3390/v7072808>
- Shahidi, M., Tay, E.S.E., Read, S.A., Ramezani-Moghadam, M., Chayama, K., George, J., Douglas, M.W., 2014. Endocannabinoid CB1 antagonists inhibit hepatitis C virus production, providing a novel class of antiviral host-targeting agents. *Journal of General Virology* 95, 2468–2479. <https://doi.org/10.1099/vir.0.067231-0>
- Shi, Q., Jiang, J., Luo, G., 2013. Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *J Virol* 87, 6866–6875. <https://doi.org/10.1128/JVI.03475-12>
- Shi, S.T., Polyak, S.J., Tu, H., Taylor, D.R., Gretch, D.R., Lai, M.M.C., 2002. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 292, 198–210. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1225>
- Shi, Z., Liu, X., Wu, S., Song, N., Tang, Q., Li, H., Luo, S., Chan, A.S.C., Cai, X., Liu, H., Jiang, X., 2024. Discovery of novel peptide antagonists targeting GPR55 for liver inflammation and fibrosis. *J. Med. Chem.* 67, 12085–12098. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00834>
- Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R.K., Kempf, B.J., Spaniel, C., Barton, D.J., Lemon, S.M., 2012. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2–miR-122 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 941–946. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112263109>
- Shimotohno, K., 2021. HCV assembly and egress via modifications in host lipid metabolic systems. *Cold Spring Harb Perspect Med* 11, a036814. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036814>
- Simcocks, A.C., O'Keefe, L., Jenkin, K.A., Mathai, M.L., Hryciw, D.H., McAinch, A.J., 2014. A potential role for GPR55 in the regulation of energy homeostasis. *Drug Discovery Today* 19, 1145–1151. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.12.005>

- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B., Stapleton, J.T., ICTV Report Consortium, 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology* 98, 2–3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>
- Sir, D., James Ou, J., 2010. Autophagy in viral replication and pathogenesis. *Molecules and Cells* 29, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0014-2>
- Sizova, D.V., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Hellen, C.U.T., 1998. Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol* 72, 4775–4782. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.6.4775-4782.1998>
- Stančić, A., Jandl, K., Hasenöhr, C., Reichmann, F., Marsche, G., Schuligoi, R., Heinemann, A., Storr, M., Schicho, R., 2015. The GPR55 antagonist CID16020046 protects against intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 1432–1445. <https://doi.org/10.1111/nmo.12639>
- Statello, L., Guo, C.-J., Chen, L.-L., Huarte, M., 2021. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Staton, P.C., Hatcher, J.P., Walker, D.J., Morrison, A.D., Shapland, E.M., Hughes, J.P., Chong, E., Mander, P.K., Green, P.J., Billinton, A., Fulleylove, M., Lancaster, H.C., Smith, J.C., Bailey, L.T., Wise, A., Brown, A.J., Richardson, J.C., Chessell, I.P., 2008. The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 139, 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.006>
- Steinmann, E., Pietschmann, T., 2010. Hepatitis C virus p7 - A viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* 2, 2078–2095. <https://doi.org/10.3390/v2092078>
- Syed, G.H., Khan, M., Yang, S., Siddiqui, A., 2017. Hepatitis C virus lipoviroparticles assemble in the endoplasmic reticulum (ER) and bud off from the ER to the Golgi compartment in COPII vesicles. *J Virol* 91, e00499-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00499-17>
- Tabata, K., Neufeldt, C.J., Bartenschlager, R., 2020. Hepatitis C virus replication. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10, a037093. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037093>
- Taylor, D.R., Puig, M., Darnell, M.E.R., Mihalik, K., Feinstone, S.M., 2005. New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J Virol* 79, 6291–6298. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6291-6298.2005>
- Terenin, I.M., Dmitriev, S.E., Andreev, D.E., Shatsky, I.N., 2008. Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* 15, 836–841. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1445>
- Thermo Fisher Scientific, 2024a. TURBO™ DNase [online] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/AM2238> (abgerufen am 01.09.24).
- Thermo Fisher Scientific, 2024b. Basic principles of RT-qPCR [online] <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html> (abgerufen 01.09.24).

- Thermo Fisher Scientific, 2016. TRIzol Reagent - User Guide. [online] https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf (abgerufen am 19.12.24)
- Thermo Fisher Scientific, 2011. T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers: Assessment of Nucleic Acid Purity. [online] https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.researchgate.net/profile/Kai-Ling-Liang/post/Is_it_possible_that_purified_RNA_has_very_high_260_280_and_260_230_ratio/attachment/59d626bd79197b8077985034/AS%253A323066943475712%25401454036569525/download/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf&ved=2ahUKEwj69euKI_uLAXVGBdsEHYxZPNsQFnoECBQQAQ&usg=AOvVaw3-Yn8RiBuQ7QZePhOjt4Os (abgerufen am 08.03.25)
- Thermo Fisher Scientific (Ed.), 2008. T009-Technical Bulletin NanoDrop 1000 & 8000: 260/280 and 260/230 Ratios. [online] https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf (abgerufen am 08.03.25)
- Thimme, R., Binder, M., Bartenschlager, R., 2012. Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol Rev* 36, 663–683. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00319.x>
- Thrift, A.P., El-Serag, H.B., Kanwal, F., 2017. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 122–132. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.176>
- Toni, L.S., Garcia, A.M., Jeffrey, D.A., Jiang, X., Stauffer, B.L., Miyamoto, S.D., Sucharov, C.C., 2018. Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX* 5, 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.011>
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., Nomoto, A., 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66, 1476–1483. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.3.1476-1483.1992>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C.A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.-H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J., Pontén, F., 2015. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Unfried, J.P., Fortes, P., 2020. LncRNAs in HCV infection and HCV-related liver disease. *IJMS* 21, 2255. <https://doi.org/10.3390/ijms21062255>
- University of California Santa-Cruz, 2024. UCSC In-Silico PCR. UCSC In-Silico PCR. [online] <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr> (abgerufen am 05.06.2023)
- Van Der Poorten, D., Shahidi, M., Tay, E., Sessa, J., Tran, K., McLeod, D., Milliken, J.S., Ho, V., Hebbard, L.W., Douglas, M.W., George, J., 2010. Hepatitis C virus induces the cannabinoid receptor 1. *PLoS ONE* 5, e12841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012841>
- Varabyou, A., Sommer, M.J., Erdogdu, B., Shinder, I., Minkin, I., Chao, K.-H., Park, S., Heinz, J., Pockrandt, C., Shumate, A., Rincon, N., Puiu, D., Steinegger, M., Salzberg, S.L., Pertea, M., 2023. CHES3: An improved, comprehensive catalog of human

genes and transcripts based on large-scale expression data, phylogenetic analysis, and protein structure. *Genome Biol* 24, 249. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-03088-4>

Vieyres, G., Pietschmann, T., 2019. HCV pit stop at the lipid droplet: Refuel lipids and put on a lipoprotein coat before exit. *Cells* 8, 233. <https://doi.org/10.3390/cells8030233>

Voisset, C., Dubuisson, J., 2004. Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biology of the Cell* 96, 413–413. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.03.008>

Volders, P.-J., Anckaert, J., Verheggen, K., Nuytens, J., Martens, L., Mestdagh, P., Vandesompele, J., 2019. LNCipedia 5: Towards a reference set of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research* 47, D135–D139. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1031>

Wang, T., Xia, K., Qiu, T., Han, S., Chen, Z., Ma, X., Zhang, L., Zou, J., Zhang, Y., Yu, B., Kong, C., Guo, J., Liu, Y., Zhou, J., Zheng, S., 2023. A comprehensive survival and prognosis analysis of GPR55 expression in hepatocellular carcinoma. *Aging* 15, 8930–8947. <https://doi.org/10.18632/aging.205008>

Wang, Y., Liu, J., Huang, B., Xu, Y.-M., Li, J., Huang, L.-F., Lin, J., Zhang, J., Min, Q.-H., Yang, W.-M., Wang, X.-Z., 2015. Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical Reports* 3, 152–158. <https://doi.org/10.3892/br.2014.407>

Włodarczyk, M., Sobolewska-Włodarczyk, A., Cygankiewicz, A.I., Jacenik, D., Krajewska, W.M., Stec-Michalska, K., Piechota-Polańczyk, A., Wiśniewska-Jarosińska, M., Fichna, J., 2017. G protein-coupled receptor 55 (GPR55) expresses differently in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 52, 711–715. <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1298834>

Wnorowski, A., Wójcik, J., Maj, M., 2021. Gene expression data mining reveals the involvement of GPR55 and its endogenous ligands in immune response, cancer, and differentiation. *IJMS* 22, 13328. <https://doi.org/10.3390/ijms222413328>

Wong, M.-T., Chen, S.S.-L., 2016. Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection. *Cell Mol Immunol* 13, 11–35. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.127>

World Health Organization, 2023. Hepatitis C, Fact Sheet [online] <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (abgerufen am 18.02.24).

World Health Organization, 2018. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. World Health Organization, Geneva. [online] <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550345> (abgerufen am 08.03.25)

Wu, C.-S., Chen, H., Sun, H., Zhu, J., Jew, C.P., Wager-Miller, J., Straiker, A., Spencer, C., Bradshaw, H., Mackie, K., Lu, H.-C., 2013. GPR55, a G protein-coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS ONE* 8, e60314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060314>

Xie, Q., Chen, S., Tian, R., Huang, X., Deng, R., Xue, B., Qin, Y., Xu, Y., Wang, J., Guo, M., Chen, J., Tang, S., Li, G., Zhu, H., 2018a. Long noncoding RNA ITPRIP-1 positively regulates the innate immune response through promotion of oligomerization and activation of MDA5. *J Virol* 92, e00507-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00507-18>

Xie, Q., Chen, S., Tian, R., Huang, X., Deng, R., Xue, B., Qin, Y., Xu, Y., Wang, J.,

- Guo, M., Chen, J., Tang, S., Li, G., Zhu, H., 2018b. Long noncoding RNA ITPRIP-1 positively regulates the innate immune response through promotion of oligomerization and activation of MDA5. *J Virol* 92, e00507-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00507-18>
- Xiong, Y., Jia, M., Yuan, J., Zhang, C., Zhu, Y., Kuang, X., Lan, L., Wang, X., 2015a. STAT3-regulated long non-coding RNAs Inc-7SK and Inc-IGF2-AS promote hepatitis C virus replication. *Molecular Medicine Reports* 12, 6738–6744. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4278>
- Xiong, Y., Yuan, J., Zhang, C., Zhu, Y., Kuang, X., Lan, L., Wang, X., 2015b. The STAT3-regulated long non-coding RNA Lethe promote the HCV replication. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 72, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.019>
- Xu, L., Sun, L., Guan, G., Huang, Q., Lv, J., Yan, L., Ling, L., Zhang, Y., 2019. The effects of pH and salts on nucleic acid partitioning during phenol extraction. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 38, 305–320. <https://doi.org/10.1080/15257770.2018.1533138>
- Yang, H., Zhou, J., Lehmann, C., 2016. GPR55 – a putative “type 3” cannabinoid receptor in inflammation. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 27. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0080>
- Ye, L., Cao, Z., Wang, W., Zhou, N., 2019. New insights in cannabinoid receptor structure and signaling. *CMP* 12, 239–248. <https://doi.org/10.2174/1874467212666190215112036>
- Zayas, M., Long, G., Madan, V., Bartenschlager, R., 2016. Coordination of hepatitis C virus assembly by distinct regulatory regions in nonstructural protein 5A. *PLoS Pathog* 12, e1005376. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005376>
- Zeisel, M.B., Felmlee, D.J., Baumert, T.F., 2013. Hepatitis C virus entry, in: Bartenschlager, R. (Ed.), *Hepatitis C virus: From molecular virology to antiviral therapy*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 87–112. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_4
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., Filipowicz, W., 2004. Single processing center models for human dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.017>
- Zhang, J., Byrne, C.D., 1999. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem J* 337 (Pt 2), 231–241.
- Zhao, L., Wang, J., Li, Y., Song, T., Wu, Y., Fang, S., Bu, D., Li, H., Sun, L., Pei, D., Zheng, Y., Huang, J., Xu, M., Chen, R., Zhao, Y., He, S., 2021. NONCODEV6: An updated database dedicated to long non-coding RNA annotation in both animals and plants. *Nucleic Acids Research* 49, D165–D171. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1046>
- Zhao, T., 2019. Long noncoding RNA and its role in virus infection and pathogenesis. *Front Biosci* 24, 777–789. <https://doi.org/10.2741/4750>
- Zhao, Y., Li, M.-C., Konaté, M.M., Chen, L., Das, B., Karlovich, C., Williams, P.M., Evrard, Y.A., Doroshow, J.H., McShane, L.M., 2021. TPM, FPKM, or Normalized Counts? A comparative study of quantification measures for the analysis of RNA-seq data from the NCI patient-derived models repository. *J Transl Med* 19, 269. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02936-w>

Zhou, J., Burkovskiy, I., Yang, H., Sardinha, J., Lehmann, C., 2016. CB2 and GPR55 receptors as therapeutic targets for systemic immune dysregulation. *Front. Pharmacol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00264>

Zhu, H., Geng, Y., He, Q., Li, M., 2018. miRNAs regulate immune response and signaling during hepatitis C virus infection. *Eur J Med Res* 23, 19. <https://doi.org/10.1186/s40001-018-0317-x>

12 Anhang

12.1	Sequenzen der GPR55 Spleißvarianten (cDNA).....	168
12.2	Primersets validiert an genomischer DNA.....	180
12.2.1	Primer Set 1 an gDNA	180
12.2.2	Primer Set 2 an gDNA	180
12.2.3	Primer Set 3 an gDNA	181
12.2.4	Primer Set 4 an gDNA	181
12.2.5	Primer Set 5 an gDNA	181
12.2.6	Primer Set 6 an gDNA	181
12.2.7	Primer Set 7 an gDNA	181
12.2.8	Primer Set 8 an gDNA	181
12.2.9	Primer Set 9 an gDNA	182
12.2.10	Primer Set 10 an gDNA	182
12.2.11	Primer Set 11 an gDNA	182
12.2.12	Primer Set 12 an gDNA	182
12.2.13	Primer Set 13 an gDNA	183
12.2.14	Primer Set 14 an gDNA	183
12.3	Western Blots	184
12.3.1	Western Blot Transfektion 1	184
12.3.2	Western Blot Transfektion 2	184
12.3.3	Western Blot Transfektion 3	185
12.3.4	Western Blot Transfektion 4	185

12.1 Sequenzen der GPR55 Spleißvarianten (cDNA)

Spleißvariante 1: NM_005683.4; ENST00000650999.1

>NM_005683.4 Homo sapiens G protein-coupled receptor 55 (GPR55), mRNA
AGAACAGGCTGACAGCCAGGCCTGGAGGAGAAATGACATCTCTCAGCCCTCTCAGCTGCACCCGGACCACC
AACAGTTGTGATTCAATGGGCATGAATTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCTTGACAAAAGT
CATTTGAATCCATCACTTCAAGAGAGTGAAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAGAAACA
TGAGTCAGCAAAACACCAGTGGGGACTGCCTGTTTGACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCTACAGTT
TGCAGTCCACATCCCCACCTTCGTCTGGGCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTCAGCACC
TTCCTTAAGAACAGGTGGCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTTGACC
TGCTGCTGGTGTCTCCCTCCCATTCAAGATGGTCTGTCCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCCTGTG
CACCTGGTGGAGTGCCTTTACTTCGTGACATGTACGGAAGCGTCTTCACCATCTGCTTCATCAGCATG
GACCGGTTCTTGCCATCCGTTACCCGCTACTGGTGAGCCACCTCCGGTCCCCCAGGAAGATCTTTGGGA
TCTGCTGCACCATCTGGGTCCTGGTGTGGACCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAGTGGA
AAAATACATGTGCTTCCACAACATGTCTGATGATACCTGGAGCGCAAGGTCTTCTTCCCGCTGGAGGTG
TTTGGCTTCCCTCCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTGGGCC
GCCGAGACCACACCCAGGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGGCTGT
CTTCGTGGTCTCCTTCCCTCCCAGTCCACCTGGGGTCTTCCCTGCAGTTCCTGGTGAGAAAACAGCTTTATC
GTAGAGTGCAGAGCCAAGCAGAGCATCAGCTTCTTCTTGAATTGTCCATGTGTTTCTCCAACGTCAACT
GCTGCCTGGATGTTTTCTGCTACTACTTTGTGATCAAAGAATTCCGCATGAACATCAGGGCCACCGGCC
TTCCAGGTCAGCTGGTCTGCAGGACACCACGATCTCCCGGGCTAACGGAAGGACATCCTGTTTCAGG
GGAAGAAAGCCCTGGCCCTGAATTCTGGTAACGGATATCGCGTTCAGGGTTTTGATGTGGTGGGATGAT
CCGCACCATCTTCACTGATGTGCTTCCCTTTGATGCCCATGAGTGCCAGCTTTGCTCATTATACCCCCAA
AGACCTTTTTTCCACTGCCAGACAGCTTATACCACCCAGTGTTCAGGGATCTCTGAAGAACCCACAGAC
CAGGTGAATTACTGATTTCTAAGTCCAAAACATATAGAGCAGAAGAATTGAGAAAGAGAATGAGACCATG
TCAACAAGGCTGTTTCCAACCTCTCCCCATTTTCTGTTGACTGGGAGGTCTTGAAAGAAAAGAGAGAGA
GAGAAAAGAGGTAAGGAGGGGAGCCAAGAGAGTCAGTTATTGGGGAGAGTGTCTTGGGCAGAGGTGGGGT
GGTAGGGATGAGTGAAGTCCCTTTTTAGTTTGGGTGTCCAGAACAGAGCAGACTTGCATTTTCCAGTCC
CTTCTGAACTGTGTTGCCAAAAGCCTCACTGAGATGACAGCAAGAAGGGGTGGTGTGGGGCTGGGCAA
GTAGCATGGATCACCCCAAGTTTCCAGTGAGCCTCAGAAAGGTGAAGGAAGCCAGCCACACCTTTCCGTG
CCCGTGAGAAGACTGCAAAATGACTGAGTGGGGTGTGATGACATCCAAGAGCCATGAGGGGGGAGAGGA
AAGGACACTTCTGGGAAGGAAGAAGACAGGCCAGGGCTGGAAGCACACAGCCCTCCCCTATCACCAT
CAGGGTGTCCACAGCACGGAGTGTGGTGTGGCCAGGGTGAAGAGAGACAGTGAGAGACGGCCTGGGA
GCGGGGAGACCCGACCTGCTTTCTATCTTAAACAGACTGGGAAGTTGCTCATTACAGCTAGCTTCCCTG
AAAACAATGGCAAAGAATCAGGCCTGCCTTGGTTCACCATAGGAGGGTGGAGGAGGTGCTGTCTTACTC
ACCTGCATCCTGGCTGGGCAGCTGGCACCCGTGGCACTGCCCATGGAGCCGTCCCTCCCTGGCAGCTGGG
AGGGAGATGAGGCAGCTAGGCACAAGGGTGTGGCCTTGAGAAAGAAGGCAAGGGGGGTCCCTGCTGGTC
CCAGGAAACTGTAAACAATTGAGTCACGCCTGGATGGCTTCTCAACGGATCTGGAGGAGGAGTGCAAGTG
ACAGCGGAAGCCTCCCAATGACTCAGCTGCTCCGGAGAGTGAAATGATGAGAAGGATCCATTTGTGGGGTG
GTTTTGCATGACAGAGCGAGTGGGATGAGGAGTAACTGATGAGACTTCATGTGAGCAAGGTCTTCAGGAG
GAAAAGCAACTGAGGTCTACTTGTAGGATCTGGGCTCAGTGGGGCTGAAGGGCTTGGGAGGGGTGGTGA
CCTGAGGGGAAGAAGAGAAGCATTGATATAAACCCTGGACCTGTGGGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAAGAG
GAAAAGGAGGGGAAGCTGAGCCGTGGCCCTAGGCTTGAAGCCTGCAGGGAGTGCAGGGTGGTGGGGAAC
CTGGCTGAGCTGCTTCCCTGCCTGAGAGCTTTCCAGCTGGCCTAAGAGCCATGGACGGACAGGAGTCGCC
TTCTCAGGAGCAGCTCCCGCTGTTGCTGTGTTCAAGTGGCACCCCTGTACACCTCCTCCTAGGTGGATGGA
GGGAAGGGTGAGGAAGAGAGCGTCAATGAAGGGGTGGAAGTGGATGTGGAGGAGTGACCAGACCAGACCA
GACCAGACCAGAGGGATCGGAGGCTCAGGCCCCCTGAGCTGGGCCTCTAAGAACCACAGCCACAGAGTCA
GGCTCTGCAGACCCAGAGGTAAGGCTGCCTGGCTGCCCCAAACCCAGACACTCCTCTCCTTGCTGCAG
GCTGCCCTCTCCATGGCCACCCTAGACAGAGACCCACCCGTGATACTCTGAGGGAGCCAGACTTTTACA
TGCAACGGGGCATTGGGGCTGGTTCGGGTGAGTGTCTACGGGTGGTGGATTTAGTGACCACCTCCTCC
CACTTCTTTCTCTGCACGAGGAGTTGGGAGCCTGCCTGGTGGAGTTGAGTGATGCCCGTCATGTGCACTT
GGGTCTACCAATGTGCTTAAGGCCAGATGGGCTTCTAAGAGACAAGGGTGGGTGGACCTAACCAACTAT

CATCCCCAGCGATGTTCAAACATAAAAATCTTATCTATGTGCAGCATGACTCTCTCCAGGTGACAGAAAGG
GCTCTAGACAGCTGAGAGGACCTGATCATGTAGGGAGGGACGGGGAGGGGAGCCAGGACCCAGGAGCTGC
ATGGCTGTAAGAGGAAGGTCCTTGGAGGGTATCAGCAGTCTCAGTGTGATGTGACAACTATGGACCTGTG
GGTGTGCCCTGGGGACCCCTGACCCATCCCCAAAACACTGTGAAAGAAGGGCCTCTTCTCCGTGGGGACC
CGTGTCTGTGGGAGCGGGCACAGGTCCATGCTGCAGGCCACTACGGCTGCTCGGCAGGAGGGCCGAGAGT
TTGGACCCACATAGCTGCAACCCAAGCTGGCCATAATCAGCAGTGGGGCCCAGCAGCACAGGAGGGGCG
GACGGTTAGCTTTGAAAAAATGACTTGATTAATCTGATTCGCCAAATAAATAGATTCATGTGA

Spleißvariante 2: XM_005246952.5

>XM_005246952.5 PREDICTED: Homo sapiens G protein-coupled receptor 55
(GPR55), transcript variant X1, mRNA

AGAACAGGCTGACAGCCAGGCTGGAGGAGAAATGACATCTCTCAGCCCTCTCAGCTGCACCCGACCACC
AACAGGTAACAGCCTCTGGGCCATTTAGAGAAACTAAGGCACGGAGCCTCCAACCTGACCTTGCTCTTGT
GGACTGCAGTTGTGATTCAATGGGCATGAATTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCCTTGACA
AAGTCATTTGAATCCATCACTTCAAGAGAGTGAAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAGA
AACATGAGTCAGCAAAACACCAGTGGGGACTGCCTGTTTACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCTTAC
AGTTTGCAGTCCACATCCCCACCTTTCGTCTGGGCCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTACG
CACCTTCTTAAGAACAGGTGGCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTT
GACCTGCTGCTGGTGTCTCCCTCCCATTCAAGATGGTCTGTCCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCC
TGTGCACCCTGGTGGAGTGCCTTTACTTCGTCAGCATGTACGGAAGCGTCTTCACCATCTGCTTCATCAG
CATGGACCCGTTCTTGGCCATCCGTTACCCGCTACTGGTGAGCCACCTCCGGTCCCCAGGAAGATCTTT
GGGATCTGCTGCACCATCTGGGTCTGGTGTGGACCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAG
TGGAAAAATACATGTGCTTCCACAACATGTCTGATGATACCTGGAGCGCAAGGTCTTCTTCCCGCTGGA
GGTGTGGTGGCTTCTCCTTCCCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTG
GGCCCGGAGACCACACCCAGGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGG
CTGTCTTCGTGGTCTCCTTCCCTCCCAGTCCACCTGGGGTCTTCCCTGCAGTTCCTGGTGAGAAACAGCTT
TATCGTAGAGTGCAGAGCCAAGCAGAGCATCAGCTTCTTCTTCAATTGTCCATGTGTTTCTCCAACGTC
AACTGCTGCCTGGATGTTTTCTGCTACTACTTTGTTCATCAAAGAATTCCGCATGAACATCAGGGCCACC
GGCCTTCCAGGGTCCAGCTGGTCTGCAGGACACCACGATCTCCCGGGCTAACGGAAGGACATCCTGTT
CAGGGGAAGAAAGCCCTGGCCCTGAATTCTGGTAACGGATATCGCGTTCAGGGTTTTGATGTGGTGGGA
TGATCCGCACCATCTTCACTGATGTGCTTCCCTTTGATGCCCATTGAGTGCCAGCTTTGCTCATTATACC
CCAAAGACCTTTTTTCCACTGCCAGACAGCTTATACCACCCAGTGTTTCAGGGATCTCTGAAGAACCAC
AGACCAGGTGAATTACTGATTTCTAAGTCCAAAAACTATAGAGCAGAAGAATTGAGAAAGAGAATGAGAC
CATGTCAACAAGGCTGTTTCCAACCTCTCCCCATTTTCTGTTTGCAGTGGGAGGTTCTGGAAAGAAAAGAGA
GAGAGAGAAAAGAGGTAAAGGAGGGAGCCAAGAGAGTCAGTTATTGGGGAGAGTGTCTTGGGCAGAGGTG
GGGTGGTAGGGATGAGTGAAGTCCCTTTTTAGTTTGGGTGTCCCAGAACAGAGCAGACTTGCATTTTTCCA
GTCCCTTCTGAACTGTGTTGCCAAAAGCCTCACTGAGATGACAGCAAGAAGGGGTGGTGTGGGGCTGG
GCAAGTAGCATGGATCACCCCAAGTTTCCAGTGCAGCCTCAGAAAGGTGAAGGAAGCCAGCCACACCTTTC
CGTGCCCGTGAGAAGACTGCAAAATGACTGAGTGGGGTGTGATGACATCCAAGAGCCATGAGGGGGGAG
AGGAAAGGACACTTCTGGGGAAGGAAGAAGACAGGCCAGGGCTGGAAGCACACAGCCCTCCCCTATCA
CCATCAGGGTGTCCACAGCACGGAGTGTGGTGTGCTGGCCAGGGTGAAGAGAGACAGTGAAGAGACGGCCT
GGGAGCGGGGAGACCCGACCTGCTTTCTATCTTAAACAGACTGGGAAGTTGCTCATTACAGCTAGCTTC
CTTGAACAATGGCAAAGAATCAGGCCTGCCTTGGTTCCACCATAGGAGGGTGGAGGAGGTGCTGTCTT
ACTCACCTGCATCCTGGCTGGGCAGCTGGCACCCGTGGCACTGCCCATGGAGCCGTCCCTCCCTGGCAGC
TGGGAGGGAGATGAGGCAGCTAGGCACAAGGGTGTGGCCTTGAAGAAAGCAAGGGGGGGTCCCTGCT
GGTCCCAGGAACTGTAAACAATTGAGTCACGCCTGGATGGCTTCTCAACGGATCTGGAGGAGGAGTGCA
AGTGACAGCGGAAGCCTCCCAATGACTCAGCTGCTCCGGAGAGTGAAATGATGAGAAGGATCCATTGTGG
GGTGGTTTTGCATGACAGAGCGAGTGGGATGAGGAGTAACTGATGAGACTTCATGTGAGCAAGGTCTTCA
GGAGGAAAAGCAACTGAGGTCTACTTGTAGGATCTGGGCTCAGTGGGGCTGAAGGGCTTGGGAGGGGTG
GTGACCTGAGGGGAAGAAGAGAAGCATTGGATAAACCTGGACCTGTGGGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGA
AGAGGAAAAGGAGGGGAAGCTGAGCCGTGGCCCTAGGCTTGAAGCCTGCAGGGAGTGCAGGGTGGGTGGG

GAACCTGGCTGAGCTGCTTCCCTGCCTGAGAGCTTTCCCAGCTGGCCTAAGAGCCATGGACGGACAGGAGT
 CGCCTTCTCAGGAGCAGCTCCCCTGTTGCTGTGTTCAAGTGGCACCCCTGTACACCTCCTCCTAGGTGGA
 TGGAGGGAAGGGTGAGGAAGAGAGCGTCAATGAAGGGGTGGAAGTGGATGTGGAGGAGTGACCAGACCAG
 ACCAGACCAGACCAGAGGGATCGGAGGCTCAGGCCCCCTGAGCTGGGCCTCTAAGAACCACAGCCACAGA
 GTCAGGCTCTGCAGACCCAGAGGTAAGGCTGCCTGGCTGCCCCAAACCCAGACACTCCTCCTTGCCT
 GCAGGCTGCCCTCTCCATGGCCACCCTAGACAGAGACCCACCCGTGATACTCTGAGGGAGCCAGACTTT
 CACATGCAACGGGGCATTGGGGCTGGTTTCGGGTCAGTGTCTACGGGTGGTGGATTAGTGACCACCCCTC
 CTCCCCTTCTTTCTCTGCACGAGGAGTTGGGAGCCTGCCTGGTGGAGTTGAGTGATGCCCGTCATGTGC
 ACTTGGGTCTACCAATGTGCTTAAGGCCAGATGGGCTTCTAAGAGACAAGGGTGGGTGGACCTAACCAA
 CTATCATCCCCAGCGATGTTCAAACATAAAATCTTATCTATGTGCAGCATGACTCTCTCCAGGTGACAGA
 AAGGGCTCTAGACAGCTGAGAGGACCTGATCATGTAGGGAGGGACGGGGAGGGGAGCCAGGACCCAGGAG
 CTGCATGGCTGTAAGAGGAAGGTCTTTGGAGGGTATCAGCAGTCTCAGTGTGATGTGACAACCTATGGACC
 TGTGGGTGTGCCCTGGGGACCCCTGACCCATCCCAAAACACTGTGGAAAGAAGGGCCTCTCTCCGTGGG
 GACCCGTGTCTGTGGGAGCGGGCACAGGTCCATGCTGCAGGCCACTACGGCTGCTCGGCAGGAGGGCCGA
 GAGTTTGGACCCACATAGCTGCAACCCAAGCTGGCCATAATCAGCAGTGGGGCCAGCAGCACAGGAGG
 GGCGGACGGTTAGCTTTGGAAAAAATGACTTGATTAATCTGATTGCGCCAAATAAATAGATTCATGTGA

Spleißvariante 3: XM_011512175.4

>XM_011512175.4 PREDICTED: Homo sapiens G protein-coupled receptor 55
 (GPR55), transcript variant X2, mRNA
 GTGGCCTTTCTCTTTTTCTCCCCGATGGAGACTGGAAGGCTAGAGGGGGCCTGAAGTTATCTCATTGCC
 CTTCCCCTAGGGCAGATAAGGCCCTGGTAAGGCAGTGTCTTTGATGAGAACACTTAAGGAGAACAGAAT
 GCTCTGGGCTTTCAAATGGTTACTTTTTCGGCTGGGCATGGTTTTAAATGGTTACTTTTTCTCTCTGTT
 GCCTGAAGCCTGGGGATTTTTCTCCTGTCTTACAGTGAGAACTGGTGACCTTCTGGAGGTAACCCCA
 GGAAAATGTGGGGCTTCCCTACTACAGGGACCCAGGACTTTATGACACTTAAGCTAGCCAAACACTCA
 GCCTCCAGCAATTCGTAGGTACCATGTAAGTGTCTCCTACAAGTTGCCGGCTCCTGGGTGGCTTCTGCTT
 CTGGAAGTTGTGATTCAATGGGCATGAATTGCTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTTGACAAA
 GTCATTTGAATCCATCACTTCAAGAGAGTGAAAGGAGCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAAGAAA
 CATGAGTCAGCAAAACACCAGTGGGGACTGCCTGTTTACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCTTACAG
 TTTGCAGTCCACATCCCCACCTTCGTCTGGGCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTCAGCA
 CCTTCTTAAGAACAGGTGGCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTTGA
 CCTGCTGCTGGTGTCTCCTCCCATTCAAGATGGTCTGTCCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCCTG
 TGCACCCTGGTGGAGTGCCTTTACTTCGTACAGCATGTACGGAAGCGTCTTACCATCTGCTTCATCAGCA
 TGGACCGGTTCTTGGCCATCCGTTACCCGCTACTGGTGAGCCACCTCCGGTCCCCAGGAAGATCTTTGG
 GATCTGCTGCACCATCTGGGTCTGGTGTGGACCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAGTG
 GAAAAATACATGTGCTTCCACAACATGTCTGATGATACCTGGAGCGCCAAGGTCTTCTTCCCGCTGGAGG
 TGTTTGGCTTCTCCTTCCCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTGGG
 CCGCCGAGACCACACCAGGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGGCT
 GTCTTCGTGGTCTCCTTCCCTCCCAGTCCACCTGGGGTTCTTCTGTCAGTTCTGGTGAGAAAACAGCTTTA
 TCGTAGAGTGCAGAGCCAAGCAGAGCATCAGCTTCTTCTTGAATTTGTCCATGTGTTTCTCCAACGTCAA
 CTGCTGCCTGGATGTTTTCTGCTACTACTTTGTTCATCAAAGAATTCGCATGAACATCAGGGCCACCCG
 CCTTCCAGGGTCCAGCTGGTCTGCAGGACACCACGATCTCCCGGGCTAACGGAAGGACATCCTGTTCA
 GGGGAAGAAAGCCCTGGCCCTGAATTCTGGTAACGGATATCGCGTTCAGGGTTTTGATGTGGTGGGATG
 ATCCGACCATCTTCACTGATGTGCTTCCCTTTGATGCCATTGAGTGCCAGCTTTGCTCATTATACCC
 AAAGACCTTTTTTCCACTGCCAGACAGCTTATACCACCCAGTGTTCAGGGATCTCTGAAGAACCACAG
 ACCAGGTGAATTACTGATTTCTAAGTCCAAAAACTATAGAGCAGAAGAATTGAGAAAAGAGAATGAGACCA
 TGTCACAAGGCTGTTTCCAACCTCTCCCCATTTTCTGTTTCGACTGGGAGGTCTGGAAAAGAAAGAGAGA
 GAGAGAAAAGAGGTAAGGAGGGAGCCAAGAGAGTCAAGTTATGGGGAGAGTGTCTTGGGCAGAGGTGGG
 GTGGTAGGGATGAGTGAAGTCCCTTTTTAGTTTGGGTGTCCCAGAACAGAGCAGACTTGCATTTTCCAGT
 CCCTTCTGAACTGTGTTGCCAAAAGCCTCACTGAGATGACAGCAAGAAGGGTGGTGTGGGGCTGGGC
 AAGTAGCATGGATCACCCCAAGTTTCCAGTGAGCCTCAGAAAGGTGAAGGAAGCCAGCCACACCTTTCCG
 TGCCCGTGAGAAGACTGCAAAATGACTGAGTGGGGTGTGATGACATCCAAGAGCCATGAGGGGGGAGAG
 GAAAGGACACTTCTGGGGAAGGAAGAAGACAGGCCAGGGCTGGAAGCACACAGCCCCCTCCCTATCACC
 ATCAGGGTGTCCACAGCACGGAGTGTGGTGTGCTGGCCAGGGTGAAGAGAGACAGTGAGAGACGGCCTGG
 GAGCGGGGAGACCCGACCTGCTTTCTATCTTAAACAGACTGGGAAGTTGCTCATTACAGCTAGCTTCT
 TGAACAATGGCAAAGAATCAGGCCTGCCTTGGTTCCACCATAGGAGGGTGGAGGAGGTGCTGTCTTAC

TCACCTGCATCCTGGCTGGGCAGCTGGCACCCGTGGCACTGCCCATGGAGCCGTCCCTCCCTGGCAGCTG
 GGAGGGAGATGAGGCAGCTAGGCACAAGGGTGTGGCCTTGAGAAAAGAAGGCAAGGGGGGTCCCTGCTGG
 TCCCAGGAAACTGTAAACAATTGAGTCACGCCTGGATGGCTTCTCAACGGATCTGGAGGAGGAGTGCAAG
 TGACAGCGGAAGCCTCCCAATGACTCAGCTGCTCCGGAGAGTGAAATGATGAGAAGGATCCATTGTGGGG
 TGGTTTTGCATGACAGAGCGAGTGGGATGAGGAGTAACTGATGAGACTTCATGTGAGCAAGGTCTTCAGG
 AGGAAAAGCAACTGAGGTCTACTTGTAGGATCTGGGCTCAGTGGGGGCTGAAGGGCTTGGGAGGGGTGGT
 GACCTGAGGGGAAGAAGAGAAGCATTGGATAAACCTGGACCTGTGGGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAAG
 AGGAAAAGGAGGGGAAGCTGAGCCGTGGCCCTAGGCTTGAAGCCTGCAGGGAGTGCAGGGTGGTGGGGA
 ACCTGGCTGAGCTGCTTCCCTGCCTGAGAGCTTCCAGCTGGCCTAAGAGCCATGGACGGACAGGAGTCG
 CCTTCTCAGGAGCAGCTCCCGCTGTTGCTGTGTTCAAGTGGCACCCCTGTACACCTCCTCCTAGGTGGATG
 GAGGGAAGGGTGAGGAAGAGAGCGTCAATGAAGGGGTGGAAGTGGATGTGGAGGAGTGACCAGACCAGAC
 CAGACCAGACCAGAGGGATCGGAGGCTCAGGCCCCCTGAGCTGGGCCTCTAAGAACCACAGCCACAGAGT
 CAGGCTCTGCAGACCCAGAGGTAAGGCTGCCTGGCTGCCCCAAACCCAGACACTCCTCTCCTTGCCTGC
 AGGCTGCCCTCTCCCATGGCCACCCTAGACAGAGACCCACCCGTGATACTCTGAGGGAGCCAGACTTTCA
 CATGCAACGGGGCATTGGGGCTGGTTCCGGTTCAGTGTCTACGGGTGGTGGATTTAGTGACCACCTCCT
 CCCACTTCTTTCTCTGCACGAGGAGTTGGGAGCCTGCCTGGTGGAGTTGAGTGATGCCCGTCATGTGCAC
 TTGGGTCTACCAATGTGCTTAAGGCCAGATGGGCTTCCTAAGAGACAAGGGTGGGTGGACCTAACCAACT
 ATCATCCCCAGCGATGTTCAAACATAAAAATCTTATCTATGTGCAGCATGACTCTCTCCAGGTGACAGAAA
 GGGCTCTAGACAGCTGAGAGGACCTGATCATGTAGGGAGGGACGGGGAGGGGAGCCAGGACCCAGGAGCT
 GCATGGCTGTAAGAGGAAGGTCCTTGGAGGGTATCAGCAGTCTCAGTGTGATGTGACAACCTATGGACCTG
 TGGGTGTGCCCTGGGGACCCCTGACCCATCCCCAAACACTGTGGAAGAAGGGCCTCTTCTCCGTGGGGA
 CCCGTGTCTGTGGGAGCGGGCACAGGTCCATGCTGCAGGCCACTACGGCTGCTCGGCAGGAGGGCCGAGA
 GTTTGGACCCACATAGCTGCAACCCAAGCTGGCCATAATCAGCAGTGGGGCCCAGCAGCACAGGAGGGG
 CGGACGGTTAGCTTTGGAAAAAATGACTTGATTAATCTGATTTCGCCAAATAAATAGATTCATGTGA

Spleißvariante 4: XM_011512176.3

>XM_011512176.3 PREDICTED: Homo sapiens G protein-coupled receptor 55
 (GPR55), transcript variant X3, mRNA

AGATTCACCTTGTTCCTTGGCCCTAGAAGAAGCTGGTTCCTGAAGCTCCGAAGCTGCTCCACTGGTGAAGTC
 GAAGTTGTGATTCAATGGGCATGAATTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCCTTGACAAAGTC
 ATTTGAATCCATCACTTCAAGAGAGTGAAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAGAAACAT
 GAGTCAGCAAAACACCAGTGGGGACTGCCTGTTTACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCTACAGTTT
 GCAGTCCACATCCCCACCTTCGTCTGGGCCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTCAGCACCT
 TCCTTAAGAACAGGTGGCCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTTGACCT
 GCTGCTGGTGTCTCCCTCCCATTCAGATGGTCCCTGTCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCCTGTGC
 ACCCTGGTGGAGTGCCTTTACTTTCGTGAGCATGTACGGAAGCGTCTTACCATCTGCTTCATCAGCATGG
 ACCGTTCTTGGCCATCCGTTACCCGCTACTGGTGGACACCTCCGGTCCCCAGGAAGATCTTTGGGAT
 CTGCTGCACCATCTGGGTCTGGTGTGGACCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAAGTGGAA
 AAATACATGTGCTTCCACAACATGTCTGATGATACCTGGAGCGCCAAGGTCTTCTTCCCGCTGGAGGTGT
 TTGGCTTCCCTTCCCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTGGGCCG
 CCGAGACCACACCAGGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGGCTGTC
 TTCGTGGTCTCCTTCCCTCCAGTCCACCTGGGGTCTTCTCCTGCAGTTCCTGGTGAGAAACAGCTTTATCG
 TAGAGTGCAGAGCCAAGCAGAGCATCAGCTTCTTCTTGCAATTGTCCATGTGTTTCTCCAACGTCAACTG
 CTGCCTGGATGTTTTCTGCTACTACTTTGTTCATCAAAGAATTCCGCATGAACATCAGGGCCCACCGCCT
 TCCAGGGTCCAGCTGGTCTGCAGGACACCACGATCTCCCGGGGCTAACGGAAGGACATCCTGTTTCAGGG
 GAAGAAAGCCCTGGCCCTGAATTCTGGTAACGGATATCGCGTTCAGGGTTTTGATGTGGTGGGATGATC
 CGCACCATCTTCACTGATGTGCTTCCCTTTGATGCCCATTTGAGTGCCAGCTTTGCTCATTATACCCAAA
 GACCTTTTTTCCACTGCCAGACAGCTTATAACCACCCAGTGTTCAGGGATCTCTGAAGAACCACAGACC
 AGGTGAATTACTGATTTCTAAGTCCAAAAACTATAGAGCAGAAGAATTGAGAAAAGAGAATGAGACCATGT
 CAACAAGGCTGTTTCCAACCTCTCCCCATTTTCTGTTTCGACTGGGAGGTCTTGGAAAAGAAAGAGAGAG
 AGAAAAGAGGTAAAGGAGGGAGCCAAGAGAGTCAGTTATTGGGGAGAGTGTCTTGGGCAGAGGTGGGGTG
 GTAGGGATGAGTGAAGTCCCTTTTTAGTTTTGGGTGTCCAGAACAGAGCAGACTTGCATTTTTCCAGTCCC
 TTCTGGAACCTGTGTTGCCAAAAGCCTCACTGAGATGACAGCAAGAAGGGGTGGTGTGGGGCTGGGCAAG
 TAGCATGGATCACCCCAAGTTTTCCAGTGAGCCTCAGAAAGGTGAAGGAAGCCAGCCACACCTTCCGTGC

CCGTGAGAAGACTGCAAAATGACTGAGTGGGGTGTGATGACATCCAAGAGCCATGAGGGGGGAGAGGAA
AGGACACTTCTGGGGAAGGAAGAAGACAGGCCAGGGCTGGAAGCACACAGCCCCCTCCCTATCACCATC
AGGGTGTCCACAGCACGGAGTGTGGTGTGCTGGCCAGGGTGAAGAGAGACAGTGAGAGACGGCTGGGAG
CGGGGAGACCCCCGACCTGCTTTCTATCTTAAACAGACTGGGAAGTTGCTCATTACAGCTAGCTTCTTGA
AAACAATGGCAAAGAATCAGGCCTGCCTTGGTTCCACCATAGGAGGGTGGAGGAGGTGCTGTCTTACTCA
CCTGCATCCTGGCTGGGCAGCTGGCACCCGTGGCACTGCCCATGGAGCCGTCCCTCCCTGGCAGCTGGGA
GGGAGATGAGGCAGCTAGGCACAAGGGTGTGGCCTTGAGAAAGAAGGCAAGGGGGGGTCCCTGCTGTTCC
CAGGAAACTGTAAACAATTGAGTCACGCCTGGATGGCTTCTCAACGGATCTGGAGGAGGAGTGAAGTGA
CAGCGGAAGCCTCCCAATGACTCAGCTGCTCCGGAGAGTGAATGATGAGAAGGATCCATTGTGGGGTGG
TTTTGCATGACAGAGCGAGTGGGATGAGGAGTAACTGATGAGACTTCATGTGAGCAAGGTCTTCAGGAGG
AAAAGCAACTGAGGTCTACTTGTAGGATCTGGGCTCAGTGGGGGCTGAAGGGCTTGGGAGGGGTGGTGAC
CTGAGGGGAAGAAGAGAAGCATTGGATAAACCTGGACCTGTGGGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAAGAGG
AAAAGGAGGGGAAGCTGAGCCGTGGCCCTAGGCTTGAAGCCTGCAGGGAGTGCAGGGTGGTGGGGAACC
TGGCTGAGCTGCTTCTGCCTGAGAGCTTTCCAGCTGGCCTAAGAGCCATGGACGGACAGGAGTCGCTT
TCTCAGGAGCAGCTCCCGCTGTTGCTGTGTTCAAGTGGCACCCCTGTACACCTCCTCCTAGGTGGATGGAG
GGAAGGGTGAAGAGAGAGCGTCAATGAAGGGTGAAGTGGATGTGGAGGAGTGACCAGACCAGACCAG
ACCAGACCAGAGGGATCGGAGGCTCAGGCCCCCTGAGCTGGGCTCTAAGAACCACAGCCACAGAGTCAG
GCTCTGCAGACCCAGAGGTAAGGCTGCCTGGCTGCCCCAAACCCAGACACTCCTCTCCTTGCTGCAGG
CTGCCCTCTCCCATGGCCACCCTAGACAGAGACCCACCCGTGATACTCTGAGGGAGCCAGACTTTCACAT
GCAACGGGGCATTGGGGCTGGTTCGGGTCAGTGTCTACGGGTGGTGGATTTAGTGACCACCCTCCTCCC
ACTTCTTTCTCTGCACGAGGAGTTGGGAGCCTGCCTGGTGGAGTTGAGTGATGCCCGTCATGTGCACTTG
GGTCTACCAATGTGCTTAAGGCCAGATGGGCTTCCCTAAGAGACAAGGGTGGGTGGACCTAACCAACTATC
ATCCCCAGCGATGTTCAAACATAAAATCTTATCTATGTGCAGCATGACTCTCTCCAGGTGACAGAAAAGG
CTCTAGACAGCTGAGAGGACCTGATCATGTAGGGAGGGACGGGGAGGGGAGCCAGGACCCAGGAGCTGCA
TGGCTGTAAGAGGAAGTCTTGGAGGGTATCAGCAGTCTCAGTGTGATGTGACAACCTATGGACCTGTGG
GTGTGCCCTGGGGACCCCTGACCCATCCCAAAACTGTGGAAAGAAGGGCTCTTCTCCGTGGGGACCC
GTGTCTGTGGGAGCGGGCACAGGTCCATGCTGCAGGCCACTACGGCTGCTCGGCAGGAGGGCCGAGAGTT
TGGACCCACATAGCTGCAACCCAAGCTGGCCATAATCAGCAGTGGGGCCAGCAGCACAGGAGGGGCGG
ACGGTTAGCTTTGGAAAAATGACTTGATTAATCTGATTCCGCAAAATAAATAGATTTCATGTGA

Spleißvariante 5: ENST00000392039.2

>ENST00000392039.2 GPR55-201 cdna: protein_coding
AGAATGCTCTGGGCTTTCAAATGGTTACTTTTCGGCTGGGCATGGTTTTAAATGGTTACTTTTCTCTCTC
CTGTTGCCTGAAGCCTGGGGATTTTTCTCCTGTCTTACAGTGAGAACTGGTGACCTTCTGGAGGTAA
CCCCAGGAAAATGTGGGGCTTCCCTACTACAGGGACCCAGGACTTTATGACACTTAAGCTAGCCCAAAC
ACTCAGCCTCCAGCAATTCGTCAGGTACCATGTAAGTGTCTCTACAAGTTGCCGGCTCCTGGGTGGCTTC
TGCTTCTGGAAGTTGTGATTCAATGGGCATGAATTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCTTG
ACAAAGTCATTTGAATCCATCACTTCAAGAGAGTGAAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGA
AGAAACATGAGTCAGCAAAACACCAGTGGGGACTGCCTGTTTACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCC
TACAGTTTGCAGTCCACATCCCCACCTTCGTCTGGGCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTT
CAGCACCTTCTTAAAGAACAGGTGGCCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTC
TTTGACCTGCTGCTGGTGTCTCTCCCTCCCATTCAGATGGTCTGTCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGT
CCCTGTGCACCCTGGTGGAGTGCCTTTACTTTCGTGAGCATGTACGGAAGCGTCTTACCATCTGCTTCAT
CAGCATGGACCGTTCTTGGCCATCCGTTACCCGCTACTGGTGGACCCCTCCGGTCCCCAGGAAGATC
TTTGGGATCTGCTGCACCATCTGGGCTCCTGGTGTGGACCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGA
AAGTGGAAAAATACATGTGCTTCCACAACATGTCTGATGATACCTGGAGCGCCAAGGTCTTCTTCCCGCT
GGAGGTGTTTGGCTTCTCCTTCCCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTG
CTGGGCCGCCGAGACCACACCCAGGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCC
TGGCTGTCTTCGTGGTCTCCTTCCCTCCAGTCCACCTGGGGTCTTCTCCTGCAGTTCCTGGTGAGAAACAG
CTTTATCGTAGAGTGACAGAGCCAAGCAGAGCATCAGCTTCTTCTTGAATTTGTCATGTGTTTCTCCAAC
GTCAACTGCTGCCTGGATGTTTTCTGCTACTACTTTGTTCATCAAAGAATTCGGCATGAACATCAGGGCCC

ACCGGCCTTCCAGGGTCCAGCTGGTCCTGCAGGACACCACGATCTCCCGGGGCTAACGGAAGGACATCCT
GTTTCAGGGGAAGAAAGCCCTGGCCCTGAATTCTGGTAACGGATATCGCGTTCAGGGTTTTGATGTGGTG
GGATGATCCGCACCATCTTCACTGATGTGCTTCCCTTTGATGCCATTGAGTG

Spleißvariante 6: ENST00000392040.5

>ENST00000392040.5 GPR55-202 cdna:protein_coding
CAGGCCTGGAGGAGAAATGACATCTCTCAGCCCTCTCAGCTGCACCCGGACCACCAACAGTTGTGATTCAA
TGGGCATGAATTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCTTGACAAAGTCATTTGAATCCATCAC
TTCAAGAGAGTGAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAGAAACATGAGTCAGCAAAACAC
CAGTGGGGACTGCCTGTTTGACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCTACAGTTTGCAGTCCACATCCCC
ACCTTCGTCCTGGGCCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTTCAGCACCTTCCTTAAGAACAGGT
GGCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTTGACCTGCTGCTGGTGTCTC
CCTCCCATTCAAGATGGTCTGTCCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCCTGTGCACCTGGTGGAGTGC
CTTTACTTCGTCAGCATGTACGGAAGCGTCTTACCATCTGCTTCATCAGCATGGACCGGTTCTTGGCCA
TCCGTTACCCGCTACTGGTGAGCCACCTCCGGTCCCCAGGAAGATCTTTGGGATCTGCTGCACCATCTG
GGTCTGGTGTGGACCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAGTGGAAAAATACATGTGCTTC
CACAACATGTCTGATGATACCTGGAGCGCCAAGGTCTTCTTCCCGCTGGAGGTGTTTGGCTTCCCTCCTC
CCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTGGGCCCGGAGACCACACCCA
GGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGGCTGTCTTCGTGGTCTCCTTC
CTCCCAGTCCACCTGGGGTTCTTCCCTGCAGTTCCTGGTGGAGAAACAGCTTTATCGTAGAGTGCAGAGCCA
AGCAGAGCATCAGCTTCTTCTTGAATTGTCCATGTGTTTCTCCAACGTCAACTGCTGCCTGGATGTTTT
CTGCTACTACTTTGTCATCAAAGAATTCCGCATGAACATCAGGGCCACCGGCCTTCCAGGGTCCAGCTG
GTCCTGCAGGACACCACGATCTCCCGGGGCTAACGGAAGGACATCCTGTTTCAGGGGAAGAAAAGCCCTGGC
CCTGAATTCTGGTAACGGATATCGCGTTCAGGGTTTTGATGTGGTGGGATGATCCGCACCATCTTCACT
GATGTGCTTCCCTTTGATGCCATTGAGTGCCAGCTTGTCTCATTATACCCCAAAGACCTTTTTTCCACT
GCCCAGACAGCTTATACCACCCAGTGTTCAGGGATCTCTGAAGAACCCACAGACCAGGTGAATTACTGAT
TTCTAAGTCCAAAACTATAGAGCAGAAGAATTGAGAAAGAGAATGAGACCATGTCAACAAGGCTGTTTC
CAACTCTCCCCATTTTCTGTTGACTGGGAGGTTCTGGAAAGAAAGAGAGAGAGAGAAAAAGAGGTAAAG
GAGGGAGCCAAGAGAGTCAAGTATTGGGGAGAGTGTCTTGGGCAGAGGTGGGGTGGTAGGGATGAGTGAA
GTCCTTTTTTAGTTTGGGTGTCCAGAACAGAGCAGACTTGCATTTTCCAGTCCCTTCTGGAAGTGTGTT
GCCAAAAGCCTCACTGAGATGACAGCAAGAAGGGGTGGTGTGGGGCTGGGCAAGTAGCATGGATCACCC
CAAGTTTCCAGTGGCCTCAGAAAGGTGAAGGAAGCCAGCCACACCTTTCGTCGCCGTGAGAAGACTGC
AAAATGACTGAGTGGGGTGTGATGACATCCAAGAGCCATGAGGGGGGAGAGGAAAGGACACTTCTGGGG
AAGGAAGAAGACAGGCCAGGGCTGGAAGCACACAGCCCTCCCCTATCACCATCAGGGTGTCCACAGCA
CGGAGTGTGGTGTGGCCAGGGTGAAGAGAGACAGTGGAGACGGCCTGGGAGCGGGGAGACCCCGAC
CTGCTTTCTATCTTAAACAGACTGGGAAGTTGCTCATTACAGCTAGCTTCCCTTGAAAAAATGGCAAAGA
ATCAGGCCTGCCTTGGTTCCACCATAGGAGGGTGGAGGAGGTGCTGTCTTACTCACCTGCATCCTGGCTG
GGCAGCTGGCACCCGTGGCACTGCCATGGAGCCGTCCCTCCCTGGCAGCTGGGAGGGAGATGAGGCAGC
TAGGCACAAGGGTGTGGCCTTGAGAAAGAAGGCAAGGGGGGTCCCTGCTGGTCCCAGGAAACTGTAAAC
AATTGAGTCACGCCTGGATGGCTTCTCAACGGATCTGGAGGAGGAGTGCAAGTGACAGCGGAAGCCTCCC
AATGACTCAGCTGCTCCGGAGAGTGAAATGATGAGAAGGATCCATTGTGGGGTGGTTTTGCATGACAGAG
CGAGTGGGATGAGGAGTAACTGATGAGACTTTCATGTGAGCAAGGTCTTCAGGAGGAAAAGCAACTGAGGT
CTACTTGTAGGATCTGGGCTCAGTGGGGGCTGAAGGGCTTGGGAGGGGTGGTGCCTGAGGGGAAGAAGA
GAAGCATTTGGATAAACCTGGACCTGTGGGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAAGAGGAAAAGGAGGGGAAGC
TGAGCCGTGGCCCTAGGCTTGAAGCCTGCAGGGAGTGCAGGGTGGGTGGGGAACCTGGCTGAGCTGCTTC
CTGCCTGAGAGCTTTCCAGCTGGCCTAAGAGCCATGGACGGACAGGAGTCGCTTCTCAGGAGCAGCTC
CCGCTGTTGCTGTGTTCAAGTGGCACCCTGTACACCTCCTCCTAGGTGGATGGAGGGAAAGGGTGGAGGAAG
AGAGCGTCAATGAAGGGGTGGAAGTGGATGTGGAGGAGTGACCAGACCAGACCAGACCAGACCAGAGGGA
TCGGAGGCTCAGGCCCCCTGAGCTGGGCCTTAAGAACCACAGCCACAGAGTCAGGCTCTGCAGACCCAG
AGGTAAGGCTGCCTGGCTGCCCCAAACCCAGACACTCCTCTCCTTGCCTGCAGGCTGCCCTCTCCCATG
GCCACCCTAGACAGAGACCCACCCGTGATACTCTGAGGGAGCCAGACTTTCACATGCAACGGGGCATTTG

GGGCTGGTTCGGGTGAGTGTCTACGGGTGGTGGATTTAGTGACCACCCTCCTCCCCTTCTTTCTCTGCA
CGAGGAGTTGGGAGCCTGCCTGGTGGAGTTGAGTGATGCCCGTCATGTGCACTTGGGTCTACCAATGTGC
TTAAGGCCAGATGGGCTTCCCTAAGAGACAAGGGTGGGTGGACCTAACCAACTATCATCCCCAGCGATGTT
CAAACATAAAATCTTATCTATGTGCAGCATGACTCTCTCCAGGTGACAGAAAGGGCTCTAGACAGCTGAG
AGGACCTGATCATGTAGGGAGGGACGGGGAGGGGAGCCAGGACCCAGGAGCTGCATGGCTGTAAGAGGAA
GGTCCTTGGAGGGTATCAGCAGTCTCAGTGTGATGTGACAACTATGGACCTGTGGGTGTGCCCTGGGGAC
CCCTGACCCATCCCAAAACACTGTGGAAAGAAGGGCCTCTTCTCCGTGGGGACCCGTGTCTGTGGGAGCG
GGCACAGGTCCATGCTGCAGGCCACTACGGCTGCTCGGCAGGAGGGCCGAGAGTTTGGACCCACATAGCT
GCAACCCAAGCTGGCCATAATCAGCAGTGGGGCCCAGCAGCACAGGAGGGGCGGACGGTTAGCTTTGGA
AAAAATGACTTGATTAATCTGATTTCGCCAAATAAATAGATTTCATGTGA

Spleißvariante 7: ENST00000438398.1

>ENST00000438398.1 GPR55-203 cdna:protein_coding
CAGGCCTGGAGGAGAAATGACATCTCTCAGCCCTCTCAGCTGCACCGGACCACCAACAGTTGTGATTCAA
TGGGCATGAATTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCTTGACAAAGTCATTTGAATCCATCAC
TTCAAGAGAGTGAAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAGAAACATGAGTCAGCAAAACAC
CAGTGGGGACTGCCTGTTTACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCTACAGTTTGCAGTCCACATCCCC
ACCTTCGTCTGGGCCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTCAGCACCTTCCCTTAAGAACAGGT
GGCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTTGACCTGCTGCTGGTGTCTCTC
CCTCCCATTCAAGATGGTCTGTCCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCCTGTGCACCTGGTGGAGTGC
CTTTACTTCGTCAGCATGTACGGAAGCGTCTTACCATCTGCTTCATCAGCATGGACCGGTTCTTGGCCA
TCCGTTACCCGCTACTGGTGAGCCACCTCCGGTCCCCCAGGAAGATCTTTGGGATCTGCTGCACCATCTG
GGTCCTGGTGTGGACCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAAGTGGAAAAAATACATGTGCTTC
CACAACATGTCTGATGATACCTGGAGCGCCAAGGTCTTCTTCCCGCTGGAGGTGTTTGGCTTCCCTCCTTC
CCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTGGGCCCGGAGACCACACCCA
GGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGGCTGTCTTCGTGGTCTCCTTC
CTCCCAGTC

Spleißvariante 8: ENST00000444078.5

>ENST00000444078.5 GPR55-204 cdna:nonsense_mediated_decay
CAGGCCTGGAGGAGAAATGACATCTCTCAGCCCTCTCAGCTGCACCGGACCACCAACAGTTGTGATTCAA
TGGGCATGAATTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCTTGACAAAGTCATTTGAATCCATCAC
TTCAAGAGAGTGAAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAGAAACATGAGTCAGCAAAACAC
CAGTGGGGACTGCCTGTTTACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCTACAGTTTGCAGTCCACATCCCC
ACCTTCGTCTGGGCCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTCAGCACCTTCCCTTAAGAACAGGT
GGCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTTGACCTGCTGCTGGTGTCTCTC
CCTCCCATTCAAGATGGTCTGTCCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCCTGTGCACCTGGTGGAGTGC
CTTTACTTCGTCAGCATGTACGGAAGCGTCTTACCATCTGCTTCATCAGCATGGACCGGTTCTTGGCCA
TCCGTTACCCGCTACTGGTGAGCCACCTCCGGTCCCCCAGGAAGATCTTTGGGATCTGCTGCACCATCTG
GGTCCTGGTGTGGACCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAAGTGGAAAAAATACATGTGCTTC
CACAACATGTCTGATGATACCTGGAGCGCCAAGGTCTTCTTCCCGCTGGAGGTGTTTGGCTTCCCTCCTTC
CCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTGGGCCCGGAGACCACACCCA
GGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGGCTGTCTTCGTGGTCTCCTTC
CTCCCAGTCCACCTGGGGTTCTTCCCTGCAGTTCCTGGTGGAAACAGCTTTATCGTAGAGTGCAGAGCCA
AGCAGAGCATCAGCTTCTTCTTGAATTGTCCATGTGTTTCTCCAACGTCAACTGCTGCCTGGATGTTTT
CTGCTACTACTTTGTCATCAAAGAATTCCGCATGAACATCAGGGCCCACCGGCCTTCCAGGGTCCAGCTG
GTCCTGCAGGACACCACGATCTCCCGGGGCTAACGGAAGGACATCCTGTTTCAGGGGAAGAAAGCCCTGGC
CCTGAATTCTGGTAACGGATATCGCGTTCAGGGTTTTGATGTGGTGGGATGATCCGCACCATCTTCACT
GATGTGCTTCCCTTTGATGCCCATTGAGTGCCAGCTTTGCTCATTATACCCCAAAGACCTTTTTTCCACT

GCCCAGACAGCTTATACCACCCAGTGTTTCAGGGATCTCTGAAGAACCCACAGACCAGGTGAATTACTGAT
TTCTAAGTCCAAAACTATAGAGCAGAAGAATTGAGAAAGAGAATGAGACCATGTCAACAAGGCTGTTTC
CAACTCTCCCCATTTTCTGTTTCGACTGGGAGGTTCTGGAAAGAAAGAGAGAGAGAGAAAAAGAGGTGGAT
GGAGGGAAGGGTGAGGAAGAGAGCGTCAATGAAGGGGTGGAAGTGGATGTGGAGGAGTGACCAGACCAGA
CCAGACCAGACCAGAGGGATCGGAGGCTCAGGCCCCCTGAGCTGGGCCTCTAAGAACCACAGCCACAGAG
TCAGGCTCTGCAGACCCAGAGGTAAGGCTGCCTGGCTGCCCAAACCCAGACACTCCTCTCCTTGCCCTG
CAGGCTGCCCTCTCCCATGGCCACCCTAGACAGAGACCCACCCGTGATACTCTGAGGGAGCCAGACTTTC
ACATGCAACGGGGCATTGTTGGGGCTGGTTCGGGTCAGTGTCTACGGGTGGTGGATTTAGTGACCACCCTCC
TCCCCTTCTTTCTCTGCACGAGGAGTTGGGAGCCTGCCTGGTGGAGTTGAGTGATGCCCGTCATGTGCA
CTTGGGTCTACCAATGTGCTTAAGGCCAGATGGGCTTCCTAAGAGACAAGGGTGGGTGGACCTAACCAAC
TATCATCCCCAGCGATGTTCAAACATAAAAATCTTATCTATGTGCAGCATGACTCTCTCCAGGTGACAGAA
AGGGCTCTAGACAGCTGAGAGGACCTGATCATGTAGGGAGGGACGGGGAGGGGAGCCAGGACCCAGGAGC
TGCATGGCTGTAAGAGGAAGGTCCTTGGAGGGTATCAGCAGTCTCAGTGTGATGTGACAACCTATGGACCT
GTGGGTGTGCCCTGGGGACCCCTGACCCATCCCAAACACTGTGGAAAGAAGGGCCTTCTCCTGGGG
ACCCGTGTCTGTGGGAGCGGGCACAGGTCCATGCTGCAGGCCACTACGGCTGCTCGGCAGGAGGGCCGAG
AGTTTGGACCCACATAGCTGCAACCCAAGCTGGCCATAATCAGCAGTGGGGCCAGCAGCACAGGAGGG
GCGGACGGTTAGCTTTGGAAAAATGACTTGATTAATCTGATTTCGCCAAATAAATAGATTTCATGTGATGC
CTTGTGA

Spleißvariante 9: ENST00000622008.4

>ENST00000622008.4 GPR55-205 cdna:protein_coding
CAGGCCTGGAGGAGAAATGACATCTCTCAGCCCTCTCAGCTGCACCCGACCACCAACAGTTGTGATTCAA
TGGGCATGAATTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCTTGACAAAGTCATTTGAATCCATCAC
TTCAAGAGAGTGAAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAGAAACATGAGTCAGCAAAACAC
CAGTGGGGACTGCCTGTTTGACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCCCTACAGTTTGAGTCCACATCCCC
ACCTTCGTCTGGGCCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTCAGCACCTTCTTAAGAACAGGT
GGCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTTGACCTGCTGCTGGTGTCTC
CCTCCCATTCAAGATGGTCTGTCCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCCTGTGCACCCCTGGTGGAGTGC
CTTTACTTCGTGACATGTACGGAAGCGTCTTACCATCTGCTTCATCAGCATGGACCCGTTCTTTGGCCA
TCCGTTACCCGCTACTGGTGAGCCACCTCCGGTCCCCCAGGAAGATCTTTGGGATCTGCTGCACCATCTG
GGTCTGGTGTGGACCCGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAGTGGAAAAATACATGTGCTTC
CACAACATGTCTGATGATACCTGGAGCGCCAAGGTCTTCTTCCCGCTGGAGGTGTTTGGCTTCTCCTTC
CCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTGGGCCCGGAGACCACACCCA
GGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGGCTGTCTTCGTGGTCTCCTTC
CTCCCAGTCCACCTGGGGTTCTTCTGCTGAGTTCTGGTGGAGAAACAGCTTTATCGTAGAGTGCAGAGCCA
AGCAGAGCATCAGCTTCTTCTTGAATTGTCCATGTGTTTCTCCAACGTCAACTGCTGCCTGGATGTTTT
CTGCTACTACTTTGTGATCAAAGAATTCCGCATGAACATCAGGGCCACCCGGCTTCCAGGGTCCAGCTG
GTCCTGCAGGACACCAGATCTCCCGGGGCTAACGGAAGGACATCCTGTTTCAGGGGAAGAAAGCCCTGGC
CCTGAATTCTGGTAACGGATATCGCGTTCCAGGGTTTTGATGTGGTGGGATGATCCGCACCATCTTCACT
GATGTGCTTCCCTTTGATGCCCATGAGTGCCAGCTTTGCTCATTATACCCCAAAGACCTTTTTTCCACT
GCCCAGACAGCTTATACCACCCAGTGTTTCAGGGATCTCTGAAGAACCCACAGACCAGGTGAATTACTGAT
TTCTAAGTCCAAAACTATAGAGCAGAAGAATTGAGAAAGAGAATGAGACCATGTCAACAAGGCTGTTTC
CAACTCTCCCCATTTTCTGTTTCGACTGGGAGGTTCTGGAAAGAAAGAGAGAGAGAGAAAAAGAGGTGGAT
GGAGGGAAGGGTGAGGAAGAGAGCGTCAATGAAGGGGTGGAAGTGGATGTGGAGGAGTGACCAGACCAGA
CCAGACCAGACCAGAGGGATCGGAGGCTCAGGCCCCCTGAGCTGGGCCTCTAAGAACCACAGCCACAGAG
TCAGGCTCTGCAGACCCAGAGGTAAGGCTGCCTGGCTGCCCAAACCCAGACACTCCTCTCCTTGCCCTG
CAGGCTGCCCTCTCCCATGGCCACCCTAGACAGAGACCCACCCGTGATACTCTGAGGGAGCCAGACTTTC
ACATGCAACGGGGCATTGTTGGGGCTGGTTCGGGTCAGTGTCTACGGGTGGTGGATTTAGTGACCACCCTCC
TCCCCTTCTTTCTCTGCACGAGGAGTTGGGAGCCTGCCTGGTGGAGTTGAGTGATGCCCGTCATGTGCA
CTTGGGTCTACCAATGTGCTTAAGGCCAGATGGGCTTCCTAAGAGACAAGGGTGGGTGGACCTAACCAAC
TATCATCCCCAGCGATGTTCAAACATAAAAATCTTATCTATGTGCAGCATGACTCTCTCCAGGTGACAGAA

AGGGCTCTAGACAGCTGAGAGGACCTGATCATGTAGGGAGGGACGGGGAGGGGAGCCAGGACCCAGGAGC
TGCATGGCTGTAAGAGGAAGGTCCCTTGGAGGGTATCAGCAGTCTCAGTGTGATGTGACAACCTATGGACCT
GTGGGTGTGCCCTGGGGACCCCTGACCCATCCCAAAACACTGTGGAAAGAAGGGCCTCTTCTCCGTGGGG
ACCCGTGTCTGTGGGAGCGGGCACAGGTCCATGCTGCAGGCCACTACGGCTGCTCGGCAGGAGGGCCGAG
AGTTTGGACCCACATAGCTGCAACCCAAGCTGGCCCATAAATCAGCAGTGGGGCCAGCAGCACAGGAGGG
GCGGACGGTTAGCTTTGGAAAAATGACTTGATTAATCTGATTTCGCCAAATAAATAGATTTCATGTGATGC
CTTGTG

Spleißvariante X1: XM_054344567.1

>XM_054344567.1 PREDICTED: Homo sapiens G protein-coupled receptor 55
(GPR55), transcript variant X4, mRNA
AAGAGGGCGGGAGAGTGTAGACCCTCCTCCTGGAAACTGCTCCCCATGTCCACACTCTAGTTCCACGCAG
CCTCTCTGTAGACCCAGAGCAAGAGCCCTAAGCCAGACAGGGTGACACTGGAGCGGCTCAAAGAGCAT
CTGGTCCCACCCCTTTATTTCACTCACAAGGAAGTCGAGACCCAGAGAGGGGAAGTGACTCTCCCCAGAA
CAGGCTGACAGCCAGGCCTGGAGGAGAAATGACATCTCTCAGCCCTCTCAGCTGCACCCGACCACCAACA
GGTAACAGCCTCTGGGCCATTTAGAGAAACTAAGGCACGGAGCCTCCAACCTGACCTTGTCTTGTGGAC
TGCAGTTGTGATTCAATGGGCATGAATTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCTTGACAAAAGT
CATTTGAATCCATCACTTCAAGAGAGTGAAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAGAAAACA
TGAGTCAGCAAAACACCAGTGGGGACTGCCTGTTTGACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAAACCTACAGTT
TGCAGTCCACATCCCCACCTTCGTCTGGGCCCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTCAGCACC
TTCCTTAAGAACAGGTGGCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTTGACC
TGCTGCTGGTGTCTCCCTCCCATTCAAGATGGTCTGTCCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCCTGTG
CACCTGGTGGAGTGCCTTTACTTCGTGAGCATGTACGGAAGCGTCTTCACCATCTGCTTCATCAGCATG
GACCGGTTCTTGGCCATCCGTTACCCGCTCCTGGTGAGCCACCTCCGGTCCCCCAGGAAGATCTTTGGGA
TCTGCTGCACCATCTGGGTCTGGTGTGGACCCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAAGTGGA
AAAATACATGTGCTTCCACAACATGTCTGATGATACCTGGAGTGCCAAGGTCTTCTTCCCCTGGAGGTG
TTTGGCTTCCCTCCCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTGGGCC
GCCGAGACCACACCAGGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGGCTGT
CTTCGTGGTCTCCTTCCCTCCCAGTCCACCTGGGGTCTTCCCTGCAGTTCCTGGTGAGAAAACAGCTTTATC
GTAGAGTGCAGAGCCAAGCAGAGCATCAGCTTCTTCTTGAATTGTCCATGTGTTTCTCCAATGTCAACT
GCTGCCTGGATGTTTTCTGCTACTACTTTGTGATCAAGAATTCCGCATGAACATCAGGGCCACCAGGCC
TTCCAGGGTCCAGCTGGTCTGCAGGACACCACGATCTCCCGGGCTAACGGAAGGACATCCTGTTTCAGG
GGAAGAAAGCCCTGGCCCTGAATTCTGGTAACGGATATCGCGTTCAGGGTTTTGATGTGGTGGGATGAT
CCGCACCATCTTCACTGATGTGCTTCCCTTTGATGCCATTGAGTGCCAGCTTGTCTATTATACCCCAA
AGACCTTTTTTCCACTGCCAGACAGCTTATAACCACCCAGTGTTCAGGGATCTCTGAAGAACCACAGAC
CAGGTGAATTACTGATTTCTAAGTCCAAAAACTATAGAGCAGAAGAATTGAGAAAAGAGAATGAGACCATG
TCAACAAGGCTGTTTCCAACCTCTCCCCATTTTCTGTTGACTGGGAGGTCTTGGAAAAGAAAAGAGAGAGA
GAGAAAAGAGGTAAGGAGGGGAGCCAAGAGAGTCAGTTATTGGGGAGAGTGTCTTGGGCAGAGGTGGGGT
GGTAGGGATGAGTGAAGTCCCTTTTTAGTTTGGGTGTCCCAGAACAGAGCAGACTTGCATTTTCCAGTCC
CTTCTGGAAGTGTGTTGCCAAAAGCCTCACTGAGATGACAGCAAGAAGGGGTGGTGTGGGGCTGGGCAA
GTAGCATGGATCACCCCAAGTTTCCAGTGAACCTCAGAAAGGTGAAGGAAGCCAGCCACACCTTTCCGTG
CCCGTGAGAAGACTGCAAAATGACTGAGTGGGGTGTGATGACATCCAAGAGCCATGAGGGGGGAGAGGA
AAGGACACTTCTGGGGAAGGAAGAAGACAGGCCAGGGCTGGAAGCACACAGCCCCACCCCTATCACCAT
CAGGGTGTCCACAGCACGGAGTGTGGTGTGCCCCAGGGTGAAGAGAGACAGTGAAGAGACGGCCTGGGA
GCGGGGAGACCCGACCTGCTTTCTATCTTAAACAGACTGGGAAGTTGCTCATTACAGCTAGCTTCCCTTG
AAAACAATGGCAAAGAATCAGGCCTGCCTTGGTTCACCATAGGAGGGTGGAGGAGGTGCTGTCTTACTC
ACCTGCATCCTGGCTGGGCAGCTGGCACCCGTGGCACTGCCATGGAGCCGTCCCTCCCTGGCAGCTGGG
AGGGAGATGAGGCAGCTAGGCACAAGGGTGTGGCCTTGAGAAAAGAGGCAAGGGGGGGTCCCTGCTGGTC
CCAGGAAACTGTAAACAATTGAGTCACGCCTGGATGGCTTCTCAACGGATCTGGAGGAGGAGTGCAAGTG
ACAGCGGAAGCCTCCCAATGACTCAGCTGCTCCGGAGAGTGAAATGATGAGAAGGATCCATTGTGGGGTG
GTTTTGCATGACAGAGCGAGTGGGATGAGGAGTAACTGATGAGACTTCATGTGAGCAAGGTCTTCAGGAG

GAAAAGCAACTGAGGTCTACTTGTAGGATCTGGGCTCAGTGGGGCTGAAGGGCTTGGGAGGGGTGGTGA
CCTGAGGGGAAGAAGAGAAGCATTGGATAAACCTGGACCTGTGGGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAAGAG
GAAAAGGAGGGGAAGCTGAGCAGTGGCCCTAGGCTTGAAGCCTGCAGGGAGTGCAGGGTGGGTGGGGAAC
CTGGCTGAGCTGCTTCCCTGCCTGAGAGCTTTCCAGCTGGCCTAAGAGCCATGGACGGACAGGAGTCGCC
TTCTCAGGAGCAGCTCCCGCTGTTGCTGTGTTCAAGTGGCACCCCTGTACACCTCCTCCTAGGTGGATGGA
GGGAAGGGTGAGGAAGAGAGCGTCAATGAAGGGGTGGAAGTGGATGTGGAGGAGTGACCAGACCAGACCA
GACCAGACCAGAGGGATCGGAGGCTCAGGCCCCCTGAGCTGGGCCTCTAAGAACCACAGCCACAGAGTCA
GGCTCTGCAGACCCAGAGGTAAGGCTGCCTGGCTGCCCCAAACCCAGACACTCCTCTCCTTGCCTGCAG
GCTGCCCTCTCCCATGGCCACCCTAGACAGAGACACCACCCGTGATACTCTGAGGGAGCCAGACTTTCAC
ATGCAACGGGGCATTGGGGCTGGTTCGGGTGAGTGTACGGGTGGTGGATTTAGTGACCACCCTCCTC
CCACTTCTTTCTCTGCACGAGGAGTTGGGAGCCTGCCTGGTGGAGTTGAGTGATGCCCCGTATGTGCACT
TGGGTCTACCAATGTGCTTAAGGCCAGATGGGCTTCCCTAAGAGACAAGGGTGGGTGGACCTAACCAACTA
TCATCCCCAGCGATGTTCAAACATAAAATCTTATCTATGTGCAGCATGACTCTCTCCAGGTGACAGAAAG
GGCTCTAGACAGCTGAGAGGAAGTATCATGTAGGGAGGGACGGGGAGGGGAGCCAGGACCAGGAGCTG
CATGGCTGTAAGAGGAAGGTCTTGGAGGGTATCAGCAGTCTCAGTGTGATGTGACAACATATGGACCTGT
GGGTGTGCCCTGGGGACCCCTGACCCATCCAAAACACTGTGGAAAGAAGGGCTCTTCTCCGTGGGGAC
CCGTGTCTGTGGGAGCGGGCACAGGTCCATGCTGCAGGCCACTACGGCTGCTCGGCAGGAGGGCCGAGAG
TTTGACCCACATAGCTGCAACCCAAGCTGGCCATAATCAGCAGTGGGGCCAGCAGCACAGGAGGGGC
GGACGGTTAGCTTTGAAAAAATGACTTGATTAATCTGATTCGCCAAATAAATAGATTTCATGTGA

Spleißvariante X2: XM_054344568.1

>XM_054344568.1 PREDICTED: Homo sapiens G protein-coupled receptor 55
(GPR55), transcript variant X5, mRNA

AGAGGGGACATAGCCCTGACAACCTCCGGGCTGCAGAACTGTGAGACAATACATCTTTGTTGGTTCAGCC
ACCCAGTGTGTGGTATTTTATGGCAGCCCTAGCAAATAATACCATAAGGTACTGGGGAGGGGAGGCATT
GTGTAATCTTACAATTAATCTCAGTGGGCCAAGTCCCTGCTGTGGCCTTTCTCTTTTTCTCCCCGATG
GAGACTGGAAGGCTAGAGGGGGCCTGAAGTTATCTCATTGCCCTTCCCCTAGGGCAGATAAGGCCCTGGT
AAGGCAGTGTCTTTGATGAGAACACTTAAGGAGAACAGAATGCTCTGGGCTTTCAAAATGGTTACTTTT
CGGCTGGGCATGGTTTTAAATGGTTACTTTTTCTCTCCTGTTGCCTGAAGCCTGGGGATTTTTCTCCTGT
CTTACAGTGAGAACTGGTGACCTTCCCTGGAGGTAACCCAGGAAAATGTGGGGCTTCCCTACTACAGG
GACCCAGGACTTTATGACACTTAAGCTAGCCAAACACTCAGCCTCCAGCAATTCGTCAGGTACCATGT
AAGTGCTCCTACAAGTTGCCGGCTCCTGGGTGGCTTCTGCTTCTGGAAGTTGTGATTCAATGGGCATGAA
TTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCTTGACAAAGTCATTTGAATCCATCACTTCAAGAGAG
TGAAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAGAAACATGAGTCAGCAAAAACACCAGTGGGGAC
TGCCTGTTTGACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCCCTACAGTTTGCAGTCCACATCCCCACCTTCGTCC
TGGGCCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTCCAGCACCTTCCCTAAGAACAGGTGGCCCGATTA
TGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTTGACCTGCTGCTGGTGTCTCCCTCCCATTC
AAGATGGTCCCTGTCCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCCTGTGCACCCTGGTGGAGTGCCTTTACTTCG
TCAGCATGTACGGAAGCGTCTTACCATCTGCTTCATCAGCATGGACCGGTTCTTGGCCATCCGTTACCC
GCTCCTGGTGAGCCACCTCCGGTCCCCCAGGAAGATCTTTGGGATCTGCTGCACCATCTGGGTCCCTGGTG
TGGACCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAGTGGAAAAATACATGTGCTTCCACAACATGT
CTGATGATACCTGGAGTGCCAAGGTCTTCTTCCCGCTGGAGGTGTTTGGCTTCCCTCCTTCCCATGGGCAT
CATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTGGGCCCGGAGACCACACCAGGACTGGGTG
CAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGGCTGTCTTCGTGGTCTCCTTCTCCAGTCC
ACCTGGGGTTCTTCCCTGCAGTTCCTGGTGGAGAAACAGCTTTATCGTAGAGTGCAGAGCCAAGCAGAGCAT
CAGCTTCTTCTTGAATTGTCCATGTGTTTCTCCAATGTCAACTGCTGCCTGGATGTTTTCTGCTACTAC
TTTGTGATCAAGAATTCCGCATGAACATCAGGGCCACCGGCCCTTCCAGGGTCCAGCTGGTCCCTGCAGG
ACACCACGATCTCCCGGGCTAACGGAAGGACATCCTGTTACGGGAAGAAAGCCCTGGCCCTGAATTCT
GGTAACGGATATCGCGTTCAGGGTTTTGATGTGGTGGGATGATCCGCACCATCTTCACTGATGTGCTTC
CCTTTGATGCCCATTGAGTGCCAGCTTTGCTCATTATACCCCAAAGACCTTTTTTCCACTGCCAGACAG
CTTATACCACCCAGTGTTCAGGGATCTCTGAAGAACCACAGACCAGGTGAATTACTGATTTCTAAGTCC

AAAACTATAGAGCAGAAGAATTGAGAAAGAGAATGAGACCATGTCAACAAGGCTGTTTCCAACCTCTCCC
 CATTTCCTGTTTCGACTGGGAGGTTCTGGAAAGAAAGAGAGAGAGAGAAAAGAGGTAAAGGAGGGAGCCA
 AGAGAGTCAGTTATTGGGGAGAGTGTCTTGGGCAGAGGTGGGGTGGTAGGGATGAGTGAAGTCCCTTTTT
 AGTTTGGGTGTCCCAGAACAGAGCAGACTTGCATTTTCCAGTCCCTTCTGGAAGTGTGTTGCCAAAAGCC
 TCACTGAGATGACAGCAAGAAGGGGTGGTGTGGGGCTGGGCAAGTAGCATGGATCACCCCAAGTTTCCA
 GTGAGCCTCAGAAAGGTGAAGGAAGCCAGCCACACCTTTCCGTGCCCGTGAGAAGACTGCAAAAATGACTG
 AGTGGGGTGTGATGACATCCAAGAGCCATGAGGGGGGAGAGGAAAAGGACACTTCTGGGAAGGAAGAAG
 ACAGGCCAGGGCTGGAAGCACACAGCCCCACCCCTATCACCATCAGGGTGTCCACAGCACGGAGTGTG
 GTGCTGGCCCAGGGTGAAGAGAGACAGTGAGAGACGGCCTGGGAGCGGGGAGACCCGACCTGCTTTCTA
 TCTTAAACAGACTGGGAAGTTGCTCATTACAGCTAGCTTCCCTTGAACAATGGCAAAGAATCAGGCCCTG
 CCTTGGTTCCACCATAGGAGGGTGGAGGAGGTGCTGTCTTACTCACCTGCATCCTGGCTGGGCAGCTGGC
 ACCCGTGGCACTGCCCATGGAGCCGTCCCTCCCTGGCAGCTGGGAGGGAGATGAGGCAGCTAGGCACAAG
 GGTGTGGCCTTGAGAAAGAAGGCAAGGGGGGGTCCCTGCTGGTCCCAGGAACTGTAAACAATGAGTCA
 CGCCTGGATGGCTTCTCAACGGATCTGGAGGAGGAGTGCAAGTGACAGCGGAAGCCTCCCAATGACTCAG
 CTGCTCCGGAGAGTGAAATGATGAGAAGGATCCATTGTGGGGTGGTTTTGCATGACAGAGCGAGTGGGAT
 GAGGAGTAACTGATGAGACTTCATGTGAGCAAGGTCTTCAGGAGGAAAAGCAACTGAGGTCTACTTGTAG
 GATCTGGGCTCAGTGGGGCTGAAGGGCTTGGGAGGGGTGGTACCTGAGGGGAAGAAGAGAAGCATTTG
 GATAACCTGGACCTGTGGGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAAGAGGAAAAGGAGGGGAAGCTGAGCAGTGG
 CCCTAGGCTTGAAGCCTGCAGGGAGTGCAGGGTGGGTGGGGAACCTGGCTGAGCTGCTTCCCTGCCTGAGA
 GCTTTCCAGCTGGCCTAAGAGCCATGGACGGACAGGAGTCGCCTTCTCAGGAGCAGCTCCCCTGTGTC
 TGTGTTCAAGTGGCACCCCTGTACACCTCCTCCTAGGTGGATGGAGGGAAGGGTGAGGAAGAGAGCGTCAA
 TGAAGGGGTGGAAGTGGATGTGGAGGAGTGACCAGACCAGACCAGACCAGAGGGATCGGAGGCTC
 AGGCCCCCTGAGCTGGGCCTCTAAGAACCACAGCCACAGAGTCAGGCTCTGCAGACCCAGAGGTAAGGCT
 GCCTGGCTGCCCCAAACCCAGACACTCCTCTCCTTGCCCTGCAGGCTGCCCTCTCCCATGGCCACCCTAG
 ACAGAGACACCACCCGTGATACTCTGAGGGAGCCAGACTTTCACATGCAACGGGGCATTGTTGGGGCTGGTT
 CGGGTCAGTGTCTACGGGTGGTGGATTTAGTGACCACCCTCCTCCACTTCTTCTCTGCACGAGGAGTT
 GGGAGCCTGCCTGGTGGAGTTGAGTGTGATGCCCGTCATGTGCACCTTGGGTCTACCAATGTGCTTAAGGCCA
 GATGGGCTTCCCTAAGAGACAAGGGTGGGTGGACCTAACCAACTATCATCCCAGCGATGTTCAAACATAA
 AATCTTATCTATGTGCAGCATGACTCTCTCCAGGTGACAGAAAGGGCTCTAGACAGCTGAGAGGAACTGA
 TCATGTAGGGAGGGACGGGGAGGGGAGCCAGGACCCAGGAGCTGCATGGCTGTAAGAGGAAGTCCCTTGG
 AGGGTATCAGCAGTCTCAGTGTGATGTGACAACCTATGGACCTGTGGGTGTGCCCTGGGGACCCCTGACCC
 ATCCCAAACACTGTGGAAAGAAGGGCCTCTTCTCCGTGGGGACCCGTGTCTGTGGGAGCGGGCACAGGT
 CCATGCTGCAGGCCACTACGGCTGCTCGGCAGGAGGGCCGAGAGTTTGGACCCACATAGCTGCAACCCAA
 GCTGGCCATAATCAGCAGTGGGGCCAGCAGCACAGGAGGGGCGGACGGTTAGCTTTGGAAAAAATGAC
 TTGATTAATCTGATTTCGCCAAATAAATAGATTTCATGTGA

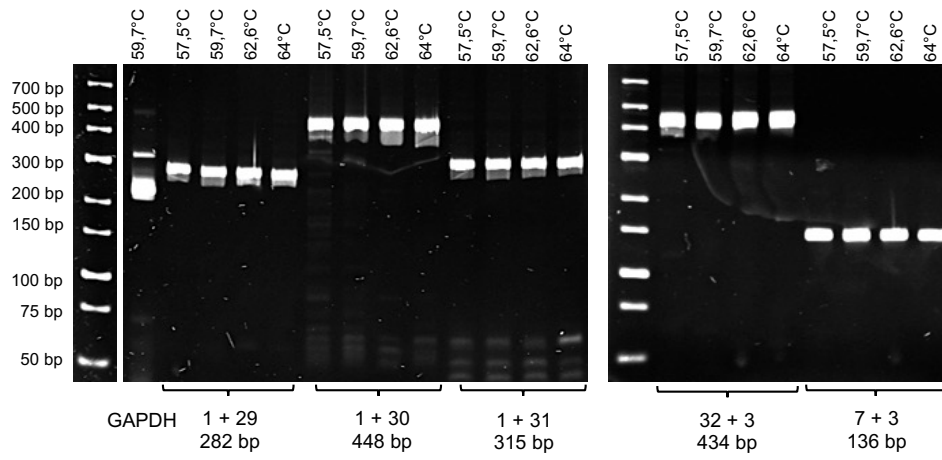
Spleißvariante X3: XM_054344569.1

>XM_054344569.1 PREDICTED: Homo sapiens G protein-coupled receptor 55
 (GPR55), transcript variant X3, mRNA
 TCAGATTCACCTTGTTCCTTGCCCTAGAAGAAGCTGGTTCCCTGAAGCTCCGAAGCTGCTCCACTGGTGAAG
 TCGAAGTTGTGATTCAATGGGCATGAATTGCTGTGTGATGCTGGGGAGGTGTTTGTGATTCTTGACAAAG
 TCATTTGAATCCATCACTTCAAGAGAGTGAAAGGAGCCCCGTCTGATCTGTTGGTGTGTAGGAAGAAAC
 ATGAGTCAGCAAAACACCAGTGGGGACTGCCTGTTTACGGTGTCAACGAGCTGATGAAAACCTACAGT
 TTGCAGTCCACATCCCCACCTTCGTCCTGGGCCTGCTCCTCAACCTGCTGGCCATCCATGGCTTCAGCAC
 CTTCCCTAAGAACAGGTGGCCCCGATTATGCTGCCACCTCCATCTACATGATCAACCTGGCAGTCTTTGAC
 CTGCTGCTGGTGTCTCCCTCCCATCAAGATGGTCCCTGTCCAGGTACAGTCCCCCTTCCCGTCCCTGT
 GCACCCTGGTGGAGTGCCTTTACTTTCGTGACATGTACGGAAGCGTCTTACCATCTGCTTCATCAGCAT
 GGACCGGTTCTTGGCCATCCGTTACCCGCTCCTGGTGGACCCCTCCGGTCCCCAGGAAGATCTTTGGG
 ATCTGCTGCACCATCTGGGTCCCTGGTGTGGACCGGAAGCATCCCTATCTACAGTTTCCATGGGAAAAGTGG
 AAAAATACATGTGCTTCCACAACATGTCTGATGATACCTGGAGTGCCAAGGTCTTCTTCCCGCTGGAGGT
 GTTTGGCTTCCCTCCTTCCCATGGGCATCATGGGCTTCTGCTGCTCCAGGAGCATCCACATCCTGCTGGGC

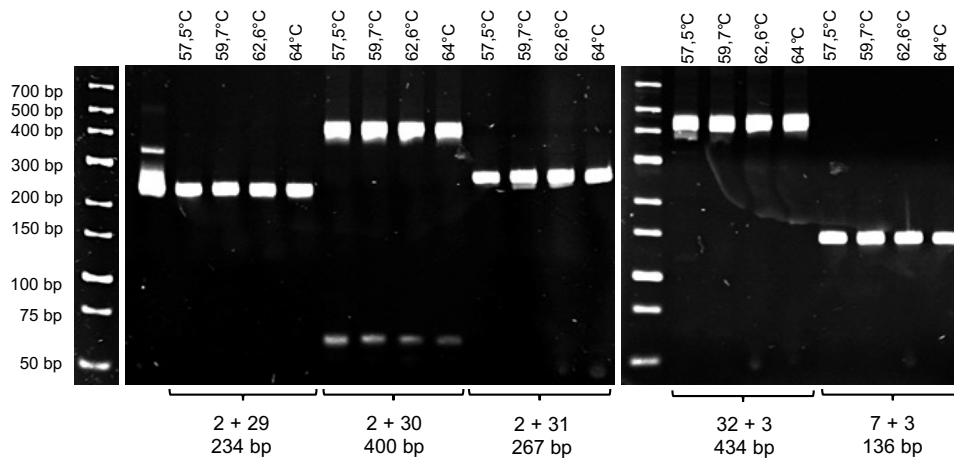
CGCCGAGACCACACCCAGGACTGGGTGCAGCAGAAAGCCTGCATCTACAGCATCGCAGCCAGCCTGGCTG
TCTTCGTGGTCTCCTTCCCTCCCAGTCCACCTGGGGTTCTTCCCTGCAGTTCTTGGTGAGAAACAGCTTTAT
CGTAGAGTGCAGAGCCAAGCAGAGCATCAGCTTCTTCTTGCAATTGTCCATGTGTTTCTCCAATGTCAAC
TGCTGCCTGGATGTTTTCTGCTACTACTTTTGTGCATCAAAGAATTCCGCATGAACATCAGGGCCCCACGGC
CTTCCAGGGTCCAGCTGGTCTGCAGGACACCACGATCTCCCGGGGCTAACGGAAGGACATCCTGTTTCAG
GGGAAGAAAGCCCTGGCCCTGAATTCTGGTAACGGATATCGCGTTCCAGGGTTTTGATGTGGTGGGATGA
TCCGCACCATCTTCACTGATGTGCTTCCCTTTGATGCCATTGAGTGCCAGCTTTGCTCATTATACCCCA
AAGACCTTTTTTCCACTGCCCAGACAGCTTATAACCACCCAGTGTTCAGGGATCTCTGAAGAACCACAGA
CCAGGTGAATTACTGATTTCTAAGTCCAAAACTATAGAGCAGAAGAATTGAGAAAGAGAATGAGACCAT
GTCAACAAGGCTGTTTTCCAATCTCCCCATTTTCTGTTTCGACTGGGAGGTTCTGGAAAGAAAAGAGAGAG
AGAGAAAAGAGGTAAAGGAGGGAGCCAAGAGAGTCAGTTATTGGGGAGAGTGTCTTGGGCAGAGGTGGGG
TGGTAGGGATGAGTGAAGTCCCTTTTTAGTTTTGGGTGTCCAGAACAGAGCAGACTTGCATTTTTCCAGTC
CCTTCTGGAAGTGTGTTGCCAAAAGCCTCACTGAGATGACAGCAAGAAGGGGTGGTGTGGGGCTGGGCA
AGTAGCATGGATCACCCCAAGTTTTCCAGTGAGCCTCAGAAAGGTGAAGGAAGCCAGCCACACCTTTCCGT
GCCCCGTGAGAAGACTGCAAAATGACTGAGTGGGGTGTGATGACATCCAAGAGCCATGAGGGGGGAGAGG
AAAGGACACTTCTGGGGAAGGAAGAAGACAGGCCAGGGCTGGAAGCACACAGCCCCACCCCTATCACCA
TCAGGGTGTCCACAGCACGGAGTGTGGTGCTGGCCAGGGTGAAGAGAGACAGTGAGAGACGGCCTGGG
AGCGGGGAGACCCCCGACCTGCTTTCTATCTTAAACAGACTGGGAAGTTGCTCATTACAGCTAGCTTCCCTT
GAAAACAATGGCAAAGAATCAGGCCTGCCTTGGTTCCACCATAGGAGGGTGGAGGAGTGCTGTCTTACT
CACCTGCATCCTGGCTGGGCAGCTGGCACCCGTGGCACTGCCATGGAGCCGTCCCTCCCTGGCAGCTGG
GAGGGAGATGAGGCAGCTAGGCACAAGGGTGTGGCCTTGAGAAAGAAGGCAAGGGGGGGTCCCTGCTGGT
CCCAGGAAACTGTAAACAATTGAGTCACGCCTGGATGGCTTCTCAACGGATCTGGAGGAGGAGTGCAAGT
GACAGCGGAAGCCTCCCAATGACTCAGCTGCTCCGGAGAGTGAATGATGAGAAGGATCCATTGTGGGGT
GGTTTTGCATGACAGAGCGAGTGGGATGAGGAGTAACTGATGAGACTTCATGTGAGCAAGGTCTTCAGGA
GGAAAAGCAACTGAGGTCTACTTGTAGGATCTGGGCTCAGTGGGGGCTGAAGGGCTTGGGAGGGTGGTG
ACCTGAGGGGAAGAAGAGAAGCATTGGATAAACCTGGACCTGTGGGGAGGAGGAGGGAAGAGGAAGA
GGAAAAGGAGGGGAAGCTGAGCAGTGGCCCTAGGCTTGAAGCCTGCAGGGAGTGCAGGGTGGGTGGGGAA
CCTGGCTGAGCTGCTTCCCTGCCTGAGAGCTTTCCAGCTGGCCTAAGAGCCATGGACGGACAGGAGTCGC
CTTCTCAGGAGCAGCTCCCGCTGTTGCTGTGTTCAAGTGGCACCCCTGTACACCTCCTCCTAGGTGGATGG
AGGGAAGGGTGGAGGAAGAGAGCGTCAATGAAGGGGTGGAAGTGGATGTGGAGGAGTGACCAGACCAGACC
AGACCAGACCAGAGGGATCGGAGGCTCAGGCCCCCTGAGCTGGGCTCTAAGAACCACAGCCACAGAGTC
AGGCTCTGCAGACCCAGAGGTAAGGCTGCCTGGCTGCCCCAAACCCAGACACTCCTCTCCTTGCTGCA
GGCTGCCCTCTCCCATGGCCACCCTAGACAGAGACACCACCCGTGATACTCTGAGGGAGCCAGACTTTCA
CATGCAACGGGGCATTGGGGCTGGTTCCGGTTCAGTGTCTACGGGTGGTGGATTTAGTGACCACCCCTCCT
CCCATTCTTTCTCTGCACGAGGAGTTGGGAGCCTGCCTGGTGGAGTTGAGTGATGCCCGTCATGTGCAC
TTGGGTCTACCAATGTGCTTAAGGCCAGATGGGCTTCCTAAGAGACAAGGGTGGGTGGACCTAACCAACT
ATCATCCCCAGCGATGTTCAAACATAAAAATCTTATCTATGTGCAGCATGACTCTCTCCAGGTGACAGAAA
GGGCTCTAGACAGCTGAGAGGAAGTATCATGTAGGGAGGGACGGGGAGGGGAGCCAGGACCCAGGAGCT
GCATGGCTGTAAGAGGAAGGTCTTGGAGGGTATCAGCAGTCTCAGTGTGATGTGACAACTATGGACCTG
TGGGTGTGCCCTGGGGACCCCTGACCCATCCCCAAACACTGTGGAAAGAAGGGCCTCTTCTCCGTGGGGA
CCCGTGTCTGTGGGAGCGGGCACAGGTCCATGCTGCAGGCCACTACGGCTGCTCGGCAGGAGGGCCGAGA
GTTTTGGACCCACATAGCTGCAACCCAAGCTGGCCATAATCAGCAGTGGGGCCCAGCAGCACAGGAGGGG
CGGACGGTTAGCTTTGGAAAAATGACTTGATTAATCTGATTCGCCAAATAAATAGATTTCATGTGA

12.2 Primersets validiert an genomischer DNA

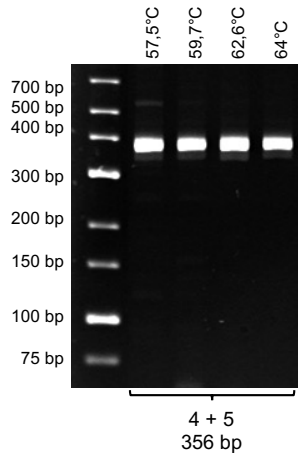
12.2.1 Primer Set 1 an gDNA



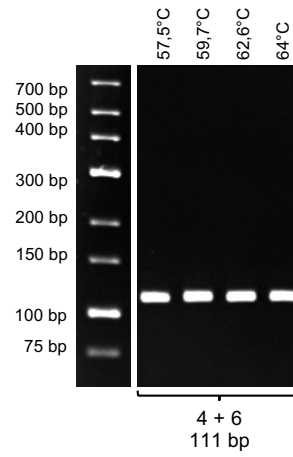
12.2.2 Primer Set 2 an gDNA



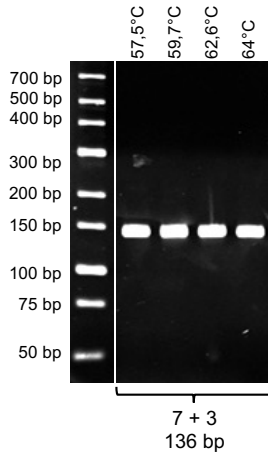
12.2.3 Primer Set 3 an gDNA



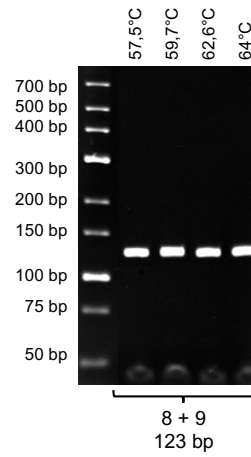
12.2.4 Primer Set 4 an gDNA



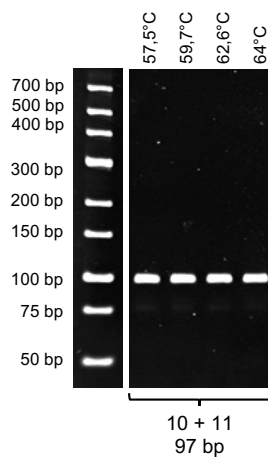
12.2.5 Primer Set 5 an gDNA



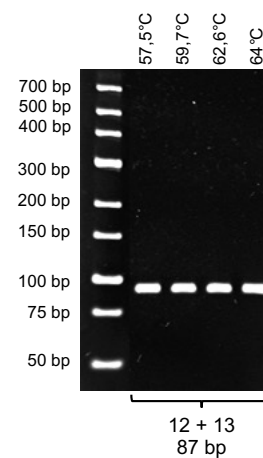
12.2.6 Primer Set 6 an gDNA

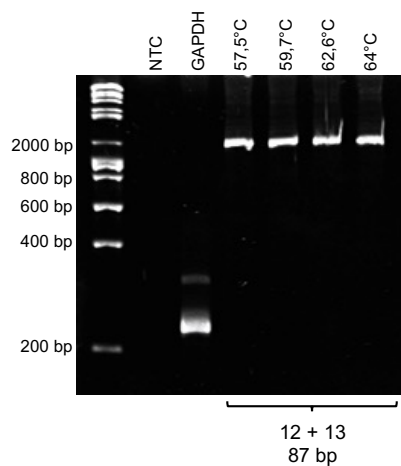
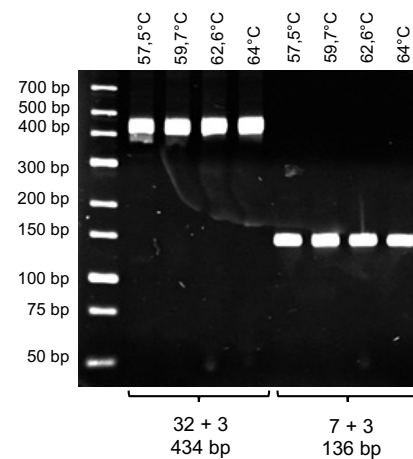


12.2.7 Primer Set 7 an gDNA

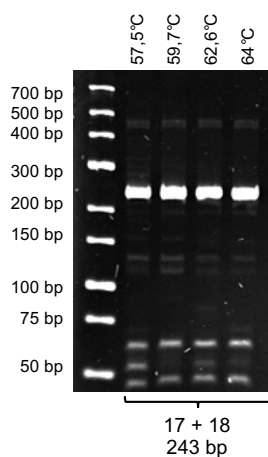


12.2.8 Primer Set 8 an gDNA

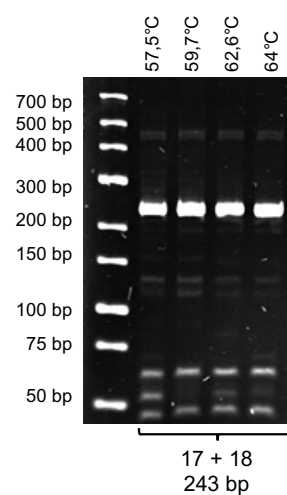


12.2.9 Primer Set 9 an gDNA**12.2.10 Primer Set 10 an gDNA**

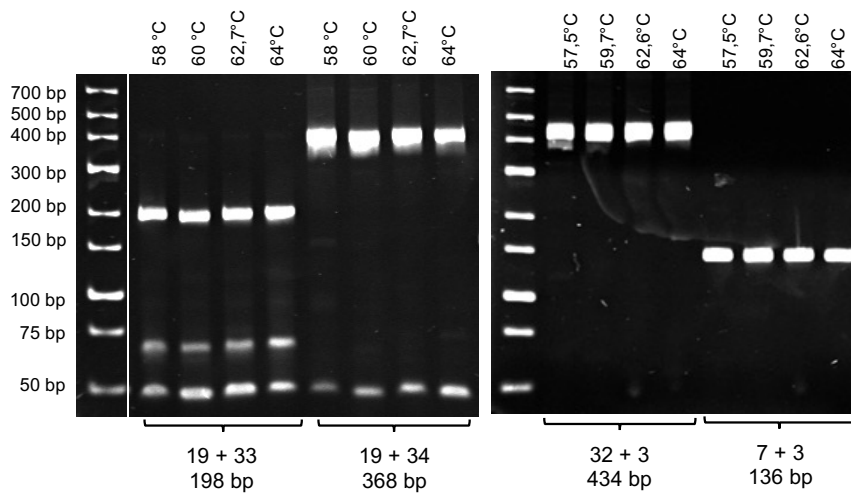
Der Forward Primer ist ein Exon-Exon-Junction-Primer, deswegen ist keine Validierung an gDNA möglich.

12.2.11 Primer Set 11 an gDNA

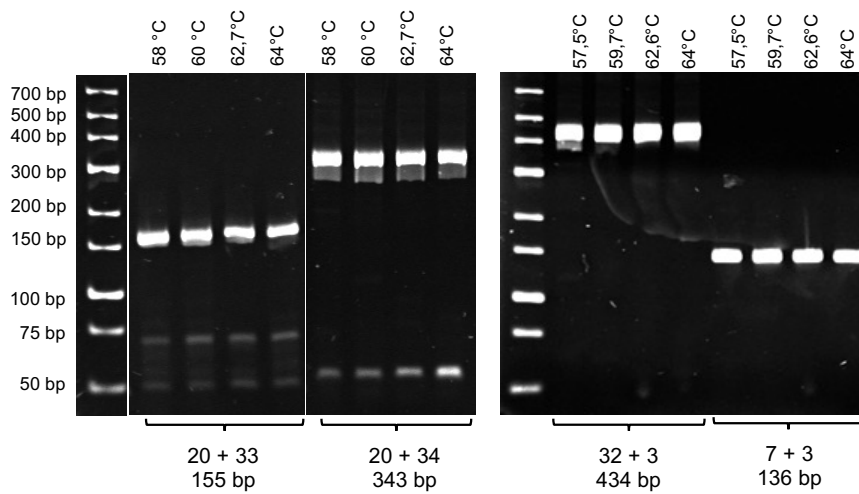
Der Forward Primer ist ein Exon-Exon-Junction-Primer, deswegen ist keine Validierung an gDNA möglich.

12.2.12 Primer Set 12 an gDNA

12.2.13 Primer Set 13 an gDNA

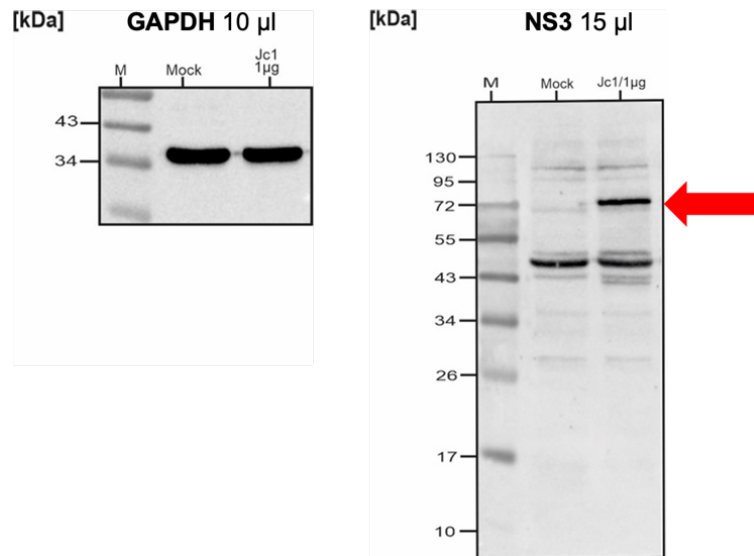


12.2.14 Primer Set 14 an gDNA

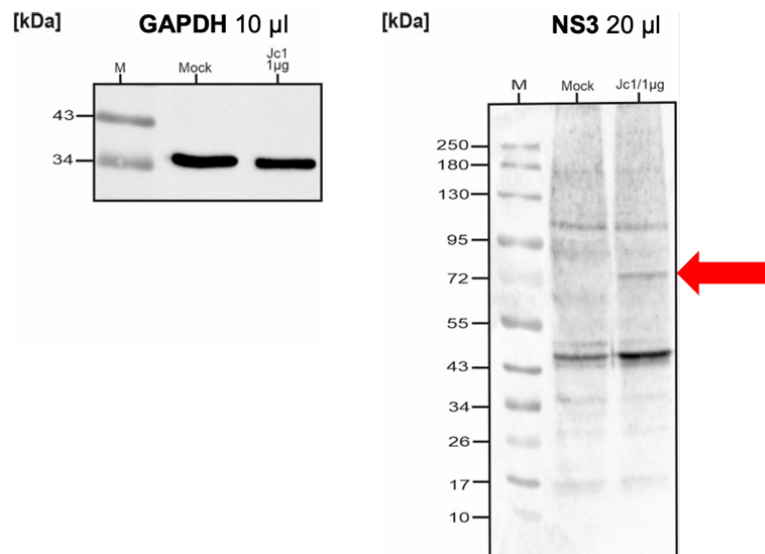


12.3 Western Blots

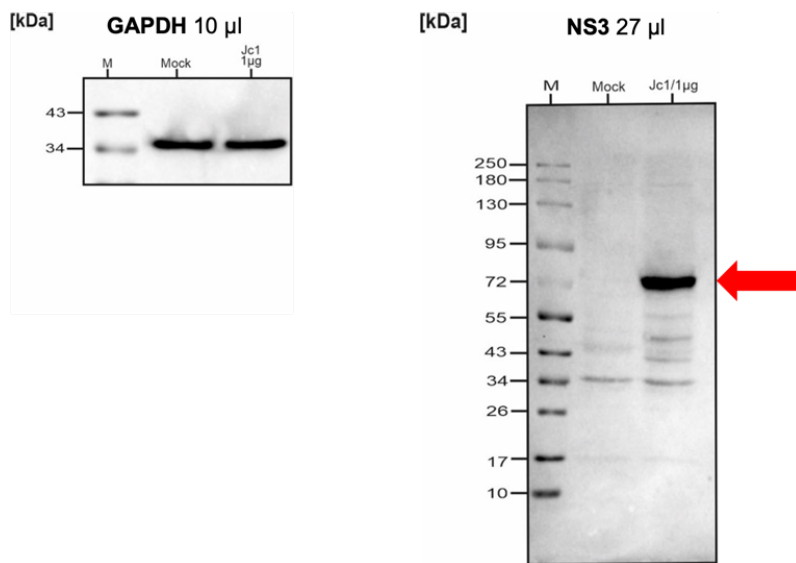
12.3.1 Western Blot Transfektion 1



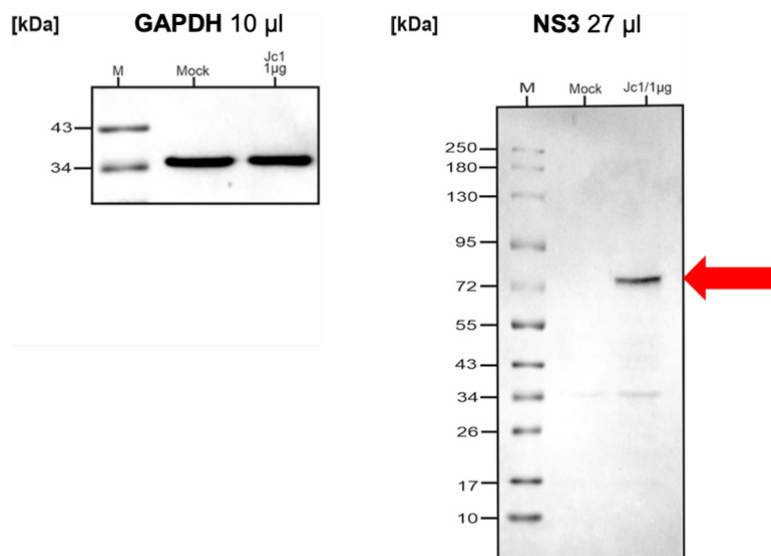
12.3.2 Western Blot Transfektion 2



12.3.3 Western Blot Transfektion 3



12.3.4 Western Blot Transfektion 4



13 Publikationsverzeichnis

- 11.11.2022 Science Day der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Medizin
 Posterpräsentation: *Investigation of the molecular mechanisms of the Inc-ITM2C-1 - GPR55 - ISG regulation axis: Determining GPR55 mRNA splice variants expressed in Huh-7 cells*
- 30.09. - 08.10.2023 29. Internationales Symposium über Hepatitis-C-Virus, Flaviviridae und verwandte Viren, Atlanta, USA
 Posterpräsentation durch Attiya Malik, AG Niepmann
25. - 28.03.2024 33. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien, Österreich
 Posterpräsentation durch Mozhdeh Khajouei, AG Niepmann
25. - 28.09.2024 30. Internationales Symposium über Hepatitis C-Virus, Flaviviridae und verwandte Viren, Oxford, Vereinigtes Königreich
 Posterpräsentation durch Mozhdeh Khajouei, AG Niepmann
- 02.04.2026 Malik, A. Q., Shalamova, L., Khajouei, M., Budnik, J., Hell, A.-L., Jost, E., Gerresheim, G. K., Rossbach, O., & Niepmann, M. (2026). Hepatitis C Virus 5'UTR Sequences That Bind eIF3 and Ribosomal 40S Subunits Confer Stimulation of Minus-Strand RNA Synthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *27*(7), 3234. <https://doi.org/10.3390/ijms27073234>

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf meinem Weg zum Abschluss dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Zunächst gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater, Prof. Dr. Michael Niepmann, für seine unermüdliche Unterstützung, wertvollen Ratschläge und die inspirierende wissenschaftliche Begleitung. Deine Expertise, Geduld, konstruktive Kritik und deine präzisen Rückmeldungen haben maßgeblich dazu beigetragen, diese Arbeit in ihrer jetzigen Form zu verwirklichen.

Mein besonderer Dank geht auch an meine Betreuerin, Mozhdeh Khajouei, deren Engagement und stetige Hilfsbereitschaft für mich von unschätzbarem Wert waren. Deine motivierenden Worte, deine fachliche Kompetenz und deine Bereitschaft, stets mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, haben mich immer vorangebracht und waren die Grundlage für unsere freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinem Partner, Malte Gürlich, für seine unerschütterliche Präsenz, Geduld und Liebe. Ohne deine ständige Ermutigung und dein Verständnis wäre dieser Weg weitaus schwieriger gewesen. Du warst mir in allen Phasen dieser Arbeit ein Fels in der Brandung.

Meiner Familie möchte ich von Herzen für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr Vertrauen danken. Ihre Liebe und ihr stetiger Zuspruch haben mir die nötige Sicherheit und Kraft gegeben, um diesen Weg zu gehen. Ohne eure unaufhörliche Förderung und eure beständige Zuwendung wäre dieser Erfolg nicht möglich gewesen.

Auch meinen Freunden und Freundinnen danke ich für ihre Geduld, ihre Aufmunterungen und für das Verständnis. Euer Zuspruch und eure Freundschaft haben mir geholfen, immer wieder neue Kraft zu schöpfen.

Zu guter Letzt danke ich allen, die mich in irgendeiner Form unterstützt haben - sei es durch inspirierende Gespräche, hilfreiche Ratschläge oder einfach durch ihre positive und aufbauende Haltung. Jede noch so kleine Geste hat einen bedeutenden Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.